



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

(11) BR 112019005548-7 B1



(22) Data do Depósito: 22/09/2017

(45) Data de Concessão: 14/06/2022

(54) Título: ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR E AAV RECOMBINANTE

(51) Int.Cl.: A61K 48/00; C12N 15/113; C12N 7/00.

(30) Prioridade Unionista: 22/09/2016 US 62/398,487.

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS.

(72) Inventor(es): CHRISTIAN MUELLER; NEIL ARONIN; EDITH L. PFISTER.

(86) Pedido PCT: PCT US2017052902 de 22/09/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/057855 de 29/03/2018

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/03/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a composições e métodos úteis para tratar a doença de Huntington. Em algumas modalidades, a descrição fornece ácidos nucleicos interferentes (por exemplo, miR-NAs artificiais) alvejando o gene da huntingtina (HTT) e métodos para o tratamento de doença de Huntington utilizando o mesmo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO, VETOR E AAV RECOMBINANTE".

PEDIDOS DE DEPÓSITO RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. § 119(e) da data de depósito do pedido de patente provisório US 62/398.487, depositado em 22 de setembro de 2016, intitulado "Tratamento da doença de Huntington com AAV", todo o conteúdo do mesmo é aqui incorporado por referência.

PESQUISA COM PATROCÍNIO DO GOVERNO FEDERAL

[0002] Esta invenção foi feita com apoio do governo sob NS038194 concedido pelo National Institutes of Health. O governo tem determinados direitos da invenção.

ANTECEDENTES

[0003] A doença de Huntington (HD) é uma doença neurodegenerativa hereditária devastadora causada por uma expansão da região de repetição CAG no exón 1 do gene da huntingtina. Enquanto a proteína huntingtina (HTT) é expressada em todo o organismo, a proteína expandida de poliglutamina é especialmente tóxica para os neurônios espinhosos médios no estriado e suas conexões corticais. Os pacientes lutam contra sintomas emocionais incluindo depressão e ansiedade e com perturbações de movimento característicos e coréia. Não há atualmente nenhuma cura para a doença de Huntington; as opções terapêuticas são limitadas a atenuar os sintomas da doença.

SUMÁRIO

[0004] Aspectos da descrição referem-se a composições e métodos úteis para tratar a doença de Huntington (HD). Em algumas modalidades, os ácidos nucleicos inibitórios (por exemplo, miRNAs, como miRNAs artificiais) são fornecidos para especificamente hibridizar e inibir a expressão da huntingtina humana (HTT).

[0005] Consequentemente, em alguns aspectos, a descrição fornece o ácido nucleico isolado compreendendo ou codificando a sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2-10 ou 21-22. Em algumas modalidades, a huntingtina humana compreende uma sequência conforme estabelecido na SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, a descrição fornece um ácido nucleico (p.ex. miRNA) que é complementar a, pelo menos, duas bases contínuas (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25) da SEQ ID NO: 1.

[0006] Em alguns aspectos, a descrição fornece um ácido nucleico isolado compreendendo: uma primeira região compreendendo uma primeira repetição terminal invertida (ITR) do vírus adeno-associado (AAV), ou uma variante dela; e, uma segunda região compreendendo um transgene codificando um ou mais miRNAs. Em algumas modalidades, a sequência codificando cada miRNA compreende uma sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2-10 flanqueadas por uma sequência codificando uma estrutura principal do miRNA.

[0007] Em algumas modalidades, cada sequência de estrutura principal do miRNA é uma sequência de estrutura principal mir-155, uma sequência de estrutura principal mir-30 ou uma sequência de estrutura principal mir-64.

[0008] Em algumas modalidades, o transgene compreende ainda uma sequência de ácidos nucleicos codificando um promotor. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor da beta-actina de frango (CBA) ou um promotor U6.

[0009] Em algumas modalidades, o transgene compreende adicionalmente uma sequência de ácidos nucleicos codificando uma proteína. Em algumas modalidades, a proteína é uma proteína terapêutica (por exemplo, huntingtina não-mutante) ou uma proteína

repórter (por exemplo, uma proteína fluorescente, como GFP).

[00010] Em algumas modalidades, o um ou mais miRNAs está localizado em uma porção não-traduzida do transgene. Em algumas modalidades, a porção não-traduzida compreende um ítron. Em algumas modalidades, a porção não-traduzida está entre o último códon da sequência de ácido nucleico codificando uma proteína e uma sequência da cauda poli-A. Em algumas modalidades, a porção não-traduzida está entre a última base de ácido nucleico de uma sequência promotora e a primeira base de uma sequência da cauda poli-A.

[00011] Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende adicionalmente uma terceira região, que compreende uma segunda repetição terminal invertida (ITR) do vírus adeno-associado (AAV) ou uma variante do mesmo.

[00012] Em algumas modalidades, a primeira ou a segunda variante ITR carece de um sítio de resolução terminal funcional (TRS), opcionalmente em que a variante ITR é uma ITR ΔTRS.

[00013] Em algumas modalidades, pelo menos um dos miRNAs se hibridiza com e inibe a expressão da huntingtina humana.

[00014] Em alguns aspectos, a descrição fornece um vetor compreendendo um ácido nucleico isolado, como descrito pela descrição. Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo.

[00015] Em alguns aspectos, a descrição fornece uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico isolado ou um vetor como descrito pela descrição.

[00016] Em alguns aspectos, a descrição fornece um AAV recombinante (rAAV) compreendendo: uma proteína do capsídeo; e um ácido nucleico isolado, como descrito pela descrição.

[00017] Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo é uma proteína do capsídeo AAV9. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 20.

[00018] Em algumas modalidades, o rAAV é um AAV autocomplementar (scAAV).

[00019] Em algumas modalidades, a rAAV é formulado para entrega ao sistema nervoso central (SNC).

[00020] Aspectos da descrição referem-se aos ácidos nucleicos isolados capazes de reduzir (por exemplo, inibindo) a expressão da huntingtina patogênica e, assim, pode ser útil para o tratamento da doença de Huntington. Consequentemente, em alguns aspectos, a descrição fornece um método para tratar a doença de Huntington em um indivíduo que precisa do mesmo, o método caracterizado pelo fato de que compreende a administração a um indivíduo tendo ou em risco de desenvolver a doença de Huntington uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ácido nucleico isolado ou rAAV conforme descrito pela descrição.

[00021] Em algumas modalidades, o indivíduo compreende um gene da huntingtina com mais de 36 repetições CAG, mais de 40 repetições, ou mais de 100 repetições. Em algumas modalidades, o indivíduo tem menos de 20 anos de idade, ou é diagnosticado como tendo HD juvenil.

[00022] Em algumas modalidades, a administração resulta na entrega do ácido nucleico isolado ou rAAV ao sistema nervoso central (SNC) do indivíduo. Em algumas modalidades, a administração é através de injeção, opcionalmente injeção intravenosa ou injeção intraestriatal.

[00023] Em alguns aspectos, a descrição fornece um ácido nucleico isolado, compreendendo um transgene codificando um ou mais miRNAs, em que a sequência do transgene codificando cada miRNA compreende uma sequência definida na SEQ ID NO: 7 ou 8 flanqueada por uma sequência de estrutura principal do miRNA.

[00024] Em algumas modalidades, cada sequência de estrutura

principal do miRNA é uma sequência de estrutura principal mir-155, uma sequência de estrutura principal mir-30 ou uma sequência de estrutura principal mir-64.

[00025] Em algumas modalidades, o transgene comprehende um promotor. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor da beta-actina de frango (CBA) ou um promotor U6.

[00026] Em algumas modalidades, o transgene comprehende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 21 ou 22.

[00027] Em algumas modalidades, o transgene é flanqueado pela repetição terminal invertida (ITRs) do vírus adeno-associado (AAV) ou suas variantes. Em algumas modalidades, a variante ITR carece de um sítio de resolução terminal funcional (TRS). Em algumas modalidades, a variante ITR faltando um TRS é uma ITR ΔTRS.

[00028] Em alguns aspectos, a descrição fornece um vetor comprehendendo um ácido nucleico isolado, comprehendendo um transgene codificando um ou mais miRNAs, em que a sequência do transgene codificando cada miRNA comprehende uma sequência definida na SEQ ID NO: 7 ou 8 flanqueada por uma sequência de estrutura principal do miRNA. Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo.

[00029] Em algumas modalidades, cada sequência de estrutura principal do miRNA do transgene é uma sequência de estrutura principal mir-155, uma sequência de estrutura principal mir-30 ou uma sequência de estrutura principal mir-64.

[00030] Em algumas modalidades, o transgene comprehende um promotor. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor da beta-actina de frango (CBA) ou um promotor U6.

[00031] Em algumas modalidades, o transgene comprehende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 21 ou 22.

[00032] Em algumas modalidades, o transgene é flanqueado pela

repetição terminal invertida (ITRs) do vírus adeno-associado (AAV) ou suas variantes. Em algumas modalidades, a variante ITR carece de um sítio de resolução terminal funcional (TRS). Em algumas modalidades, a variante ITR faltando um TRS é uma ITR ΔTRS.

[00033] Em alguns aspectos, a descrição fornece um AAV recombinante (rAAV) compreendendo uma proteína do capsídeo; e um ácido nucleico isolado, compreendendo um transgene codificando um ou mais miRNAs, em que a sequência do transgene codificando cada miRNA compreende uma sequência definida na SEQ ID NO: 7 ou 8 flanqueada por uma sequência de estrutura principal do miRNA.

[00034] Em algumas modalidades, o transgene é flanqueado por sequências de comprimento completo da ITR do AAV. Em algumas modalidades, o transgene é flanqueado por uma ITR de AAV e uma ITR ΔTRS de comprimento completo.

[00035] Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo é uma proteína do capsídeo AAV9. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 20.

[00036] Em alguns aspectos, a descrição fornece um método para tratar a doença de Huntington em um indivíduo que precisa do mesmo, o método compreendendo a administração a um indivíduo tendo ou em risco de desenvolver a doença de Huntington uma quantidade terapeuticamente eficaz de um rAAV conforme descrito aqui (p.ex., um rAAV compreendendo um transgene codificando um ou mais miRNAs, em que a sequência do transgene codificando cada miRNA compreende uma sequência apresentada na SEQ ID NO: 7 ou 8 flanqueada por uma sequência de estrutura principal do miRNA).

[00037] Em algumas modalidades, o transgene do ácido nucleico isolado é flanqueado por sequências de comprimento completo da ITR do AAV. Em algumas modalidades, o transgene é flanqueado por uma ITR de AAV e uma ITR ΔTRS de comprimento completo.

[00038] Em algumas modalidades, o rAAV comprehende uma proteína do capsídeo AAV9.

[00039] Em algumas modalidades, o indivíduo comprehende um gene da huntingtina com mais de 36 repetições CAG, mais de 40 repetições, ou mais de 100 repetições. Em algumas modalidades, o indivíduo tem menos de 20 anos de idade.

[00040] Em uma modalidade, a administração é por injeção. Em algumas modalidades, a injeção é injeção intravenosa ou injeção intrastriatal.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00041] A Figura 1 mostra células HeLa transfectadas com um plasmídeo expressando mir-HTT-6433 visando a huntingtina humana. 48 horas após a transfecção, as células foram colhidas e o RNA foi extraído por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). Os resultados indicam que o mir-HTT-6433 reduz a huntingtina humana endógena em até 50%.

[00042] A Figura 2 mostra o mir-HTT-6433 empacotado em um vetor AAV9 e injetado diretamente no estriado de camundongos transgênicos expressando a huntingtina humana mutante (camundongo Yac128). Um mês pós-injeção, os níveis de mRNA da huntingtina humana foram medidos por qRT-PCR. Em um conjunto de animais ($n=5$) os níveis da huntingtina foram comparados no lado injetado com níveis no lado não-injetado. Uma redução significante ($p = 0,0017$) do mRNA da huntingtina foi observada no lado injetado. Em um segundo conjunto de animais ($n = 5/\text{grupo}$) os níveis de mRNA da huntingtina foram comparados em animais injetados com mir-HTT-6433 para os animais que receberam uma injeção de veículo apenas. Uma redução significativa ($p = 0,0004$) da huntingtina foi observada nesses animais também. Em um terceiro conjunto de animais ($n = 5/\text{grupo}$) os níveis de mRNA da huntingtina foram comparados em

animais injetados com mir-HTT-6433 para aqueles injetado com um AAV9-GFP. Houve uma redução significativa ($p=0,0064$) no mRNA da huntingtina nesses animais também. Em resumo, os dados indicam que o mir-HTT-6433 reduz o mRNA da huntingtina in vivo no cérebro por 50%.

[00043] A Figura 3 mostra a injeção de camundongos transgênicos expressando a huntingtina mutante (humana) unilateralmente com AAV9-mir-HTT-6433 ou PBS. Seis meses pós-injeção, os camundongos foram testados em uma barra de equilíbrio. Os dados indicam que camundongos tratados com mir-HTT-6433 mostram uma redução na quantidade de tempo que levou para atravessar a barra quando comparado a camundongos HD tratados com PBS.

[00044] As Figs. 4A-4C mostram que miRNAs artificiais visando a huntingtina humana reduzir o mRNA da huntingtina em cultura de células e in vivo. A Figura 4A mostra as posições dos locais alvo sobre o mRNA da huntingtina humana. A Figura 4B mostra células HeLa transfetadas com plasmídeos expressando miRNAs artificiais visando a huntingtina humana; os níveis de mRNA da huntingtina foram medidos após 48 horas por qPCR. A expressão da huntingtina foi normalizada para HPRT para explicar a variação poço para poço no número de células e é expressada em relação ao controle não tratado/virgens de tratamento. Barras de erro representam o erro padrão. A Figura 4C mostra miRNAs candidatos selecionados para testes in vivo com base nos resultados obtidos em cultura celular. Camundongos foram injetados unilateralmente no estriado. Um mês pós-injeção, o estriado foi colhido e o tecido GFP positivo foi dissecado. Os dados são normalizados para HPRT e expressados em relação ao controle GFP somente.

[00045] As Figs. 5A-5C mostram que a expressão do miRNA artificial do promotor U6 não melhora o silenciamento da huntingtina

no estriado do camundongo. A Figura 5A mostra os dados relativos às construções de AAV9 expressando um miRNA dos promotores da CBA (polII) e U6. O miRNA dirigido pelo promotor da CBA está localizado no 3'-UTR do gene GFP, considerando que a construção contendo o miRNA artificial dirigido pelo promotor U6 co-expresa a GFP a partir de um promotor separado. A Figura 5B mostra a quantidade relativa do mRNA da huntingtina no estriado injetado após injeção dos miRNAs artificiais dirigidos pelo promotor U6 e da CBA visando os locais 5155 (esquerda) e 6433 (direita). Os dados foram expressados em relação ao lado não-injetado. A Figura 5C mostra a quantidade relativa do mRNA da huntingtina em camundongos injetados unilateralmente com o miRNA dirigido pelo promotor U6 e da CBA visando o sítio 6433. Os dados foram expressados em relação ao grupo de camundongos injetados com um vetor de controle expressando GFP.

[00046] As Figs. 6A-6B mostram que a expressão estriatal de longo prazo do mir-HTT-6433 a partir de um promotor U6 provoca anormalidades comportamentais. A Figura 6A mostra que seis meses pós-injeção, os camundongos injetados com o mir-HTT-6433 conduzido pelo promotor U6 não conseguiram fazer ninhos. As fotos foram tiradas 24 horas após a colocação de nova ninhadas na gaiola. A Figura 6B mostra o monitoramento da gaiola de camundongos Yac128 tratados com PBS, CBA-mir-HTT-6433 ou U6-mir-HTT-6433. A quantidade de tempo gasto se movendo pela gaiola foi gravado por 24-27 horas. O tempo médio por hora foi calculado dividindo a quantidade total pelo número de horas de gravação.

[00047] As Figs. 7A-7B mostram que a expressão de longo prazo do mir-HTT-6433 a partir de um promotor U6 provoca encolhimento do estriado. A Figura 7A mostra imagens representativas de coloração DARPP-32 no lado injetado em camundongos Yac128 em 1 (parte

superior) e 6 (parte inferior) meses pós-injeção. A Figura 7B mostra a quantificação da área positiva DARPP-32 seis meses pós-injeção.

[00048] As Figs. 8A-8D mostram que a expressão de longo prazo do mir-HTT-6433 a partir de um promotor U6 provoca ativação persistente da microglia. A Figura 8A mostra imagens representativas de coloração Iba1 no lado injetado em camundongos Yac128 em 1 (parte superior) e 6 (parte inferior) meses pós-injeção. As imagens foram tomadas no local da injeção. A quantificação da microglia total (FIG. 8B), ativada (FIG. 8C) e em repouso (FIG. 8D) em 6 meses pós-injeção são mostradas.

[00049] As Figs. 9A-9C mostram que a expressão do miRNA artificial com base em mir155 a partir de um promotor U6 resulta em superexpressão da huntingtina visando guiar a fita e outras sequências. A Figura 9A mostra posições de partida do mapeamento de leituras para a huntingtina visando miRNA artificial em forma de grampo (hairpin) (estrutura principal do mir-155). As posições são relatadas em relação à fita madura e as leituras são normalizadas para o número total de miRNA endógeno mapeado em cada amostra. A linha horizontal representa os níveis de fundo do miRNA artificial encontrado em amostras de controle. A Figura 9B mostra a quantificação relativa do miR-HTT maduro (estrutura principal do mir-155) por RT-PCR quantitativo. A Figura 9A mostra porções de partida do mapeamento de leituras para a huntingtina visando miRNA artificial embebido em uma estrutura principal do mir-30 e expressado a partir de um promotor U6.

[00050] As Figs. 10A-10B mostram que a expressão do mir-HTT-6433 preferencialmente diminui os mRNAs com locais de destino. A Figura 10A mostra que os mRNAs foram divididos em aqueles contendo ligação canônica do miRNA correlacionando os locais artificiais do miRNA (legenda) e aqueles sem. No grupo de

camundongos injetados com AAV-CbA-mir-HTT-6433, não há nenhuma diferença entre mRNAs com e sem tais locais. A Figura 10B mostra em contraste, que no grupo AAV-U6-mir-HTT-6433 há uma mudança no sentido de repressão de mRNAs com locais 8mer perfeitos.

[00051] As Figs. 11A-11C mostram que a redução da dose de vetor resulta na propagação reduzida e inativação no estriado de camundongo. A Figura 11A mostra que a coloração GFP no estriado de camundongos foi injetado com um vetor codificando a huntingtina visando tanto o miRNA artificial como o EGFP. A ImageJ foi usada para medir a porcentagem do estriado que foi GFP positivo. A Figura 11B mostra RT-PCR quantitativo medindo o mRNA da huntingtina humana no estriado de camundongos Yac128. A Figura 11C mostra fotografias representativas de camundongos injetados com um vetor codificando tanto o miRNA visando a huntingtina como o EGFP em três doses diferentes. Os dados indicam que reduzindo a dose do vetor resulta em redução da propagação e da inativação.

[00052] As Figs. 12A-12B mostram dados indicando que os camundongos Yac128 mostram um declínio na capacidade de atravessar a trave após a injeção do promotor U6 dirigindo a huntingtina visando o miRNA artificial. A Figura 12A mostra que camundongos injetados a 2-3 meses demonstram um claro aumento no tempo de atravessar a trave e alguns deles não conseguem nem atravessar. A Figura 12B mostra que camundongos Yac128 injetados com PBS ou CBA-mir-HTT-6433 em 7 meses de idade mostram um declínio relacionado à idade no comportamento na trave. Injeção com U6-mir-HTT-6433 (pontos vermelhos) acelera este declínio.

[00053] As Figs. 13A-13B mostram que camundongos C57BL/6 demonstram uma deterioração inicial no comportamento na trave após a injeção do promotor U6 dirigindo a huntingtina visando o miRNA

artificial. A Figura 13A mostra a quantidade de tempo necessário para atravessar a trave para os camundongos controle (virgens de tratamento) e camundongos injetados com AAV-U6-mir-HTT AAV-6433 e-CbA-mir-HTT-6433. A Figura 13B mostra a quantificação da área estriatal positiva DARPP-32 em camundongos controle (virgens de tratamento) e camundongos injetados com AAV-U6-mir-HTT AAV-6433 e-CbA-mir-HTT-6433.

[00054] As Figs. 14A-14B mostram que a distribuição dos miRNAs endógenos é largamente inalterada após a injeção com mir-HTT-6433. A Figura 14A mostra a distribuição em camundongos injetados com AAV-CbA-mir-HTT-6433; níveis das fitas guia e passageira de mir-HTT-6433 são mostrados em verde, em vermelho são todas as espécies de miRNA endógenas mostrando alterações significativas nos camundongos injetados com AAV-CbA-mir-HTT-6433. A Figura 14B mostra a distribuição em camundongos injetados com AAV-U6-mir-HTT-6433.

[00055] As Figs. 15A-15C mostram perfis de mRNA em camundongos tratados com mir-HTT-6433. A Figura 15A mostra que camundongos injetados com AAV-CbA-mir-HTT-6433 mostram poucas mudanças na expressão de mRNA; em verde estão todos os genes que mostram significantes valores de p, em azul são aqueles que continuam significativos após o ajuste para comparações múltiplas. A Figura 15B mostra que camundongos injetados com AAV-U6-mir-HTT-6433 mostram mais alterações na expressão de mRNA em comparação com o CBA. A Figura 15C mostra os perfis de mRNA em camundongos tratados com mir--HTT-6433; 7 RNAs são significativamente diferencialmente expressados entre os grupos tratados com U6 e CbA.

[00056] A Figura 16 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (*htt* humana) no caudado médio de um

modelo de ovelha da doença de Huntington, um mês após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados para o nível de expressão da *htt* em ovinos de controle não injetados também são mostrados. Os níveis de expressão de *htt* relativos foram normalizados para calnexina de ovinos. Observação: uma estrutura principal de mir155 foi utilizada em cada uma das construções CBA e U6.

[00057] A Figura 17 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (*htt* humana) no putâmen médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, um mês após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados para o nível de expressão em ovinos de controle não injetados também são mostrados. Os níveis de expressão de *htt* relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00058] A Figura 18 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (*htt* humana) no lado medial do caudado médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados do nível de expressão no lado não-injetado e no lado injetado são mostrados. Os níveis de expressão de *htt* relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00059] A Figura 19 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (*htt* humana) no lado lateral do caudado médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados do nível de expressão no lado não-injetado e no lado injetado são

mostrados. Os níveis de expressão de htt relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00060] A Figura 20 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (htt humana) no caudado médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados para o nível de expressão da htt em ovinos de controle não injetados também são mostrados. Os níveis de expressão de htt relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00061] A Figura 21 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (htt humana) no lado lateral do putâmen médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados do nível de expressão no lado não-injetado e no lado injetado são mostrados. Os níveis de expressão de htt relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00062] A Figura 22 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (htt humana) no lado medial do putâmen médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados do nível de expressão no lado não-injetado e no lado injetado são mostrados. Os níveis de expressão de htt relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00063] A Figura 23 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (htt humana) no putâmen médio de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-

mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados para o nível de expressão da *htt* em ovinos de controle não injetados também são mostrados. Os níveis de expressão de *htt* relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00064] A Figura 24 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (*htt* humana) no estriado anterior de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor de controle scAAV9 vazio. Os dados para o nível de expressão da *htt* em ovinos de controle não injetados também são mostrados. Os níveis de expressão de *htt* relativos foram normalizados para calnexina de ovinos.

[00065] As Figs. 25A-25B mostram estruturas em forma de grampo previstas do miRNA artificial visando a huntingtina humana. A Figura 25A mostra a estrutura em forma de grampo prevista do mir-155-6433 (SEQ ID NO: 23). A Figura 25B mostra a estrutura em forma de grampo prevista do mir-30-6433 (SEQ ID NO: 24).

[00066] As Figs. 26A-26B mostram a entrega de vetores AAV para o cérebro de ovinos. A Figura 26A mostra uma visão geral esquemática de um cérebro de ovelha dissecado no plano coronal (superior), de forma que todo estriado fosse contido dentro de blocos de 4, 6mm. O bloco anterior contém a porção anterior do estriado, que não é dividido pela cápsula interna (meio). Os blocos médios, para os quais a injeção é alvejada tem um putâmen definido e caudados são mostrados na parte inferior. A Figura 26B mostra genomas do vetor de AAV nos animais controle (AAV9) e tratados (AAV9miRHTT). Genomas do vetor foram medidos por PCR digital em gotas usando HPRT genômico como gene de referência. Os valores são plotados em uma escala logarítmica.

[00067] A Figura 27 mostra que a fita guia do miRNA artificial foi

quantificada por PCR digital em gotas. Os níveis de miRNA relativos foram calculados normalizando para let-7e*, e este valor foi plotado em uma escala logarítmica. Amostras com RQN < 5 foram excluídas. O número informado é o número total de amostras que sobreviveu a este limiar de qualidade e foi utilizado na análise de miRNA. Os valores de P foram calculados utilizando ANOVA de dois fatores com correção de Tukey para múltiplos testes.

[00068] A Figura 28 mostra que scAAV9-anti-HTT-6433 reduz o mRNA da huntingtina humana mutante no estriado. Os dados mostrados são o sinal para o mRNA HTT normalizado para calnexina de ovinos. Asteriscos indicam diferenças significativas nas médias entre os grupos de tratamento (AAV9 ou AAV9miRHTT) em p,0,03 ou menos com os testes t não pareados. O miRNA artificial dirigido pelo promotor U6 reduz significativamente o mRNA HTT mutante humano no caudado e putâmen em 1 mês pós-injeção e no putâmen em 6 meses pós-injeção. O miRNA artificial dirigido pelo promotor CBA reduz o mRNA HTT no caudado e putâmen e estriado anterior em 1 mês pós-injeção e no caudado e putâmen em 6 mês pós-injeção. A região mediana do caudado, putâmen lateral e estriado anterior foram examinadas na análise.

[00069] As Figs. 29A-29B mostram níveis de mRNA endógeno da HTT de ovinos e proteína em ovinos tratados com AAV9 e AAV9miRHTT. A Figura 29A mostra que os níveis de mRNA HTT de ovinos foram determinados conforme descrito em métodos e são expressados em relação à calnexina de ovinos (Canx). São apresentados resultados do Estudo 2. Não há nenhuma diferença nos níveis de mRNA HTT de ovinos endógenos entre os grupos tratados com AAV9 e AAV9miRHTT. A Figura 29B mostra os níveis da proteína mHTT humana e da huntingtina de ovinos endógenos detectados com anticorpo anti-htt1-17 (Ab1) no putâmen do Estudo 2, 6 meses pós-

injeção. Amostra de Western blot mostra sinal para HTT do tipo selvagem (seta) e HTT mutante humana (ponta de seta) para os lados injetados e não-injetados do cérebro em 4 ovinos diferentes injetados em um lado com AAV9miRHTT. O gráfico mostra sinais médios de HTT do tipo selvagem de ovelha e mHTT humana determinados a partir da densitometria como porcentagem do lado injetado para o lado não-injetado. Observe que o tratamento com AAV9miRHTT não afeta os níveis da proteína huntingtina ovina endógena, mas reduz significativamente os níveis de mHTT humana. Asterisco indica $p=0,005$ com teste t não pareado.

[00070] A Figura 30 mostra que AAV9-miRHTT reduz a proteína huntingtina humana mutante no estriado. Amostra de Western blots do putâmen dos Estudos 1 e 2 mostraram HTT mutante detectada com anticorpo 3B5H10 e actina como controle de carga (topo). Um gráfico mostra a distribuição dos valores individuais e média (barra horizontal) para ovinos tratados com AAV9 (controle) ou AAV9-miRHTT (parte inferior). Os resultados são mostrados para diferentes regiões estriatais (caudado, putâmen e estriado anterior) nos estudos 1 e 2 e 1 e 6 meses pós-injeção. No estudo 2, 6 meses pós-injeção duas áreas (área 1 e 2) foram examinadas em cada região. Asteriscos indicam diferença significativa no lado injetado entre AAV9 e AAV9-miRHTT em $p<0,05$ ou menos baseado em testes t não pareados.

[00071] A Figura 31 mostra os níveis de HTT humana mutante detectada pelo ensaio MSD em 1 e 6 meses pós-injeção no estudo 1 (promotor U6) e estudo 2 (promotor CBA). Um gráfico mostra a distribuição dos valores individuais e médias (barras horizontais) para ovinos tratados com AAV9 (controle) ou AAV9-miRHTT. Os resultados são mostrados para diferentes regiões estriatais (caudado, putâmen e estriado anterior). Asteriscos * indicam diferença significativa no lado injetado entre AAV9 e AAV9-miRHTT em $p<0,05$ ou menos baseado

em testes t não pareados.

[00072] As Figs. 32A-32B mostram que os níveis de mHTT são inalterados no córtex ipsilateral e caudado e putâmen contralateral de estriado de ovinos injetados com miRHTT. A Figura 32A mostra um gráfico indicando os níveis médios de mHTT normalizado para actina no córtex ipsilateral para o estriado injetado com miRHTT. Os dados são do estudo 1, 1 e 6 meses pós-injeção, NS, com base no teste t não pareado. A Figura 32B mostra um gráfico de barra indicando os níveis de mHTT normalizado para actina no caudado e putâmen contralateral para o estriado injetado com miRHTT. Os dados são do estudo 1, 1 e 6 meses pós-injeção, NS, com base no teste t não pareado.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00073] Aspectos da invenção referem-se a certos RNAs interferentes (por exemplo, miRNAs, como miRNAs artificiais) que quando entregues a um indivíduo são eficazes para reduzir a expressão da proteína huntingtina patogênica (HTT) no indivíduo. Consequentemente, os métodos e as composições descritos pela descrição são úteis, em algumas modalidades, para o tratamento da doença de Huntington.

Métodos para tratar a doença de Huntington

[00074] Métodos para entregar um transgene (por exemplo, um RNA inibidor, como um miRNA) para um indivíduo são fornecidos pela descrição. Os métodos geralmente envolvem a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de um ácido nucleico isolado codificando um RNA de interferência capaz de reduzir a expressão da proteína huntingtina (HTT), ou um rAAV compreendendo um ácido nucleico para expressar um RNA inibitório capaz de reduzir a expressão da proteína huntingtina.

[00075] Em alguns aspectos, a descrição fornece um miRNA

inibitório que se liga especificamente a (p.ex. se hibridiza com), pelo menos, duas bases contínuas (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais) da huntingtina humana (p.ex., SEQ ID NO: 1). Conforme usado aqui "bases contínuas" referem-se a duas ou mais bases de nucleotídeos que são ligadas covalentemente (p. ex., por uma ou mais ligação de fosfodiéster, etc.) uma a outra (por exemplo, como parte de uma molécula de ácido nucleico). Em algumas modalidades, o pelo menos um miRNA é cerca de 50%, cerca de 60% cerca de 70% cerca de 80% cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 99% ou cerca de 100% idêntica à duas ou mais bases de nucleotídeos contínua (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, ou mais) da SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o RNA inibitório é um miRNA que comprehende ou é codificado pela sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2-10.

[00076] Como usado aqui, "doença de Huntington", ou "HD", refere-se a uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo movimento progressivamente piorado, alterações cognitivas e de comportamento causadas por uma expansão de repetição de tri-nucleotídeo (por exemplo, CAG, o que é traduzido em uma poli-glutamina, ou PolyQ, trato) no gene HTT que resulta em produção de proteína huntingtina mutante patogênica (HTT ou mHTT). Em algumas modalidades, a proteína huntingtina mutante acelera a taxa de morte celular neuronal em determinadas regiões do cérebro. Em geral, a severidade da HD está correlacionada ao tamanho da expansão de repetição do tri-nucleotídeo em um indivíduo. Por exemplo, um indivíduo com uma região de repetição CAG compreendendo entre 36 e 39 repetições é caracterizado como tendo HD de "penetrância reduzida", enquanto que um indivíduo tendo maior que 40 repetições é caracterizado como tendo HD de "penetrância completa". Assim, em algumas

modalidades, um indivíduo com ou em risco de ter uma HD tem um gene HTT compreendendo entre cerca de 36 e 39 repetições CAG (por ex., 36, 37, 38 ou 39 repetições). Em algumas modalidades, um indivíduo com ou em risco de ter uma HD tem um gene HTT compreendendo 40 ou mais (por exemplo, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 ou mais) repetições CAG. Em algumas modalidades, um indivíduo com um gene HTT compreendendo mais de 100 repetições CAG desenvolve uma HD mais cedo do que um indivíduo com menos de 100 repetições CAG. Em algumas modalidades, um indivíduo com um gene HTT compreendendo mais de 100 repetições CAG pode desenvolver sintomas de HD antes da idade de cerca de 20 anos, e é referido como tendo HD juvenil (também conhecido como HD rígida acinética, ou HD variante de Westphal). O número de repetições CAG no alelo do gene HTT de um indivíduo pode ser determinado por qualquer modalidade adequada conhecida na técnica. Por exemplo, os ácidos nucleicos (p.ex, DNA) podem ser isolados a partir de uma amostra biológica (por exemplo, sangue) de um indivíduo e o número de repetições CAG de um alelo de HTT pode ser determinado por um método com base em hibridação, como PCR e sequenciamento de ácidos nucleicos (por exemplo, sequenciamento Illumina, sequenciamento Sanger, sequenciamento SMRT, etc.).

[00077] Uma “quantidade” eficaz de uma substância é uma quantidade suficiente para produzir um efeito desejado. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um ácido nucleico isolado é uma quantidade suficiente para transfectar (ou infectar no contexto da entrega mediada por rAAV) um número suficiente de células-alvo de um tecido alvo de um indivíduo. Em algumas modalidades, um tecido-alvo é o tecido do sistema nervoso central (SNC) (por exemplo, tecido cerebral, tecido da medula espinhal, líquido cefalorraquidiano (LCR), etc.). Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um ácido

nucleico isolado (por exemplo, que pode ser entregue através de um rAAV) pode ser uma quantidade suficiente para ter um benefício terapêutico em um indivíduo, por exemplo, para reduzir a expressão de um gene patogênico ou proteínas (por exemplo, HTTP), para estender o tempo de vida de um indivíduo, para melhorar no indivíduo um ou mais sintomas da doença (por exemplo, um sintoma da doença de Huntington), etc. A quantidade eficaz dependerá de uma variedade de fatores como, por exemplo, espécie, idade, peso, saúde do indivíduo e o tecido a ser direcionado, e pode assim variar entre o indivíduo e o tecido descrito em qualquer parte da descrição.

Ácidos nucleicos isolados

[00078] Em alguns aspectos, a descrição fornece ácidos nucleicos isolados que são úteis para a redução (por exemplo, inibição) da expressão da huntingtina humana (HTT). Uma sequência de “ácidos nucleicos” se refere a uma sequência de DNA ou RNA. Em algumas modalidades, as proteínas e os ácidos nucleicos da descrição são isolados. Conforme usado aqui, o termo “isolado” significa produzido artificialmente. Conforme usado aqui, com respeito a ácidos nucleicos, o termo “isolado” significa: (i) amplificado *in vitro* por meio, por exemplo, de reação em cadeia da polimerase (PCR); (ii) produção recombinante por clonagem; (iii) purificado, como pela clivagem e separação em gel; ou (iv) sintetizado por, por exemplo, síntese química. Um ácido nucleico isolado é um que é facilmente manipulável por técnicas de DNA recombinante bem conhecidas na técnica. Assim, uma sequência de nucleotídeos contida em um vetor no qual os sítios de restrição 5' e 3' são conhecidos ou para os quais as sequências de primers da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram divulgadas é considerada isolada, mas uma sequência de ácido nucleico existente em seu estado nativo em seu hospedeiro natural não é. Um ácido nucleico isolado pode ser substancialmente purificado, mas não

precisa de ser. Por exemplo, um ácido nucleico que é isolado dentro de um vetor de clonagem ou de expressão não é um puro em que ele pode incluir apenas uma pequena porcentagem do material na célula na qual ele reside. Tal ácido nucleico é isolado, no entanto, como o termo é usado aqui porque é facilmente manipulável pelas técnicas convencionais conhecidas dos versados na técnica. Conforme usado aqui, com respeito às proteínas ou aos peptídeos, o termo "isolado" se refere a uma proteína ou um peptídeo que tem sido isolado do seu ambiente natural ou artificialmente produzido (por exemplo, por síntese química, por tecnologia de DNA recombinante, etc).

[00079] O versado na técnica também perceberá que as substituições do aminoácido conservador podem ser feitas para fornecer variantes funcionalmente equivalentes ou homólogos das proteínas do capsídeo. Em alguns aspectos a divulgação abrange alterações sequenciais que resultam em substituições de aminoácidos conservadoras. Conforme usado aqui, uma substituição de aminoácidos conservadora se refere a uma substituição de aminoácidos que não altera a carga relativa ou características do tamanho da proteína em que a substituição de aminoácidos é feita. As variantes podem ser preparadas de acordo com os métodos para alterar a sequência de polipeptídeo conhecida pelo versado na técnica como são encontrados nas referências que compilam tais métodos, por exemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, ou Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. As substituições conservadoras de aminoácidos incluem substituições feitas entre aminoácidos dentro dos seguintes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; e (g) E, D. Por conseguinte, pode-se fazer substituições de aminoácidos

conservadoras para a sequência de aminoácidos das proteínas e dos polipeptídeos divulgada aqui.

[00080] Os ácidos nucleicos isolados da invenção podem ser vetores do vírus adeno-associado (AAV) recombinante (vetores rAAV). Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado. Conforme descrito pela descrição, compreende uma região (p.ex., uma primeira região), compreendendo uma primeira repetição terminal invertida (ITR) do vírus adeno-associado (AAV) ou uma variante do mesmo. O ácido nucleico isolado (por exemplo, o vetor de AAV recombinante) pode ser empacotado em uma proteína do capsídeo e administrado a um indivíduo e/ou entregue a uma célula alvo selecionada. Os “vetores recombinantes de AAV” (rAAV) são normalmente compostos de, no mínimo, um transgene e suas sequências reguladoras e repetições terminal invertida (ITR) do AAV 5' e 3'. O transgene pode compreender, conforme revelado em outro lugar neste documento, uma ou mais regiões que codificam um ou mais RNAs inibitórios (por exemplo, miRNAs) compreendendo um ácido nucleico que alveja um mRNA endógeno de um indivíduo. O transgene pode incluir também uma região de codificação, por exemplo, de uma proteína e/ou uma sequência de controle da expressão (por exemplo, uma cauda poli-A), conforme já descrito na descrição.

[00081] Em geral, as sequências ITR são cerca de 145 bp de comprimento. De preferência, substancialmente todas as sequências codificando as ITRs são usadas na molécula, embora algum grau de alteração menor destas sequências seja admissível. A capacidade de modificar estas sequências de ITR está dentro da especialidade da técnica. (Ver, por exemplo, textos como Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); e K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)). Um exemplo de tal molécula empregada na presente invenção é um

plasmídeo "de ação cis" contendo o transgene, em que a sequência do transgene e elementos reguladores associados são flanqueados pelas sequências ITR de AAV 5' e 3'. As sequências ITR de AAV podem ser obtidas a partir de qualquer AAV conhecido, incluindo tipos de AAV de mamíferos atualmente identificados. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado (por exemplo, o vetor de rAAV) compreende pelo menos uma ITR tendo um sorotipo selecionado de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, e suas variantes. Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado compreende uma região (por exemplo, uma primeira região) codificando uma ITR de AAV2.

[00082] Em algumas modalidades, o ácido nucleico isolado inclui ainda uma região (por exemplo, uma segunda, uma terceira, uma quarta região, etc.), compreendendo uma segunda ITR de AAV. Em algumas modalidades, a segunda ITR de AAV tem um sorotipo selecionado de AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, e suas variantes. Em algumas modalidades, a segunda ITR é uma ITR mutante faltando um sítio de resolução terminal funcional (TRS). O termo "faltando um sítio de resolução terminal" pode se referir a uma ITR de AAV que compreende uma mutação (por exemplo, uma mutação sem sentido como uma mutação não sinônima, ou mutação de sentido trocado) que anula a função do sítio de resolução de terminal (TRS) da ITR, ou a uma ITR de AAV truncada que carece de uma sequência de ácido nucleico codificando um TRS funcional (por exemplo, uma ITR ΔTRS). Sem o desejo de se vincular à qualquer teoria específica, um vetor de rAAV compreendendo uma ITR faltando um TRS produz um vetor de rAAV autocomplementar, por exemplo, como descrito por McCarthy (2008) Molecular Therapy 16(10):1648-1656.

[00083] Além dos elementos principais identificados acima para o

vetor recombinante de AAV, o vetor também inclui elementos de controle convencionais que são funcionalmente ligados com elementos do transgene em uma forma que permita a sua transcrição, tradução e/ou expressão em uma célula transfetada com o vetor ou infectada com o vírus produzido pela invenção. Conforme usado aqui, sequências “funcionalmente ligadas” incluem as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controle de expressão que atuam em trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse. As sequências de controle de expressão incluem a iniciação da transcrição adequada, terminação, promotor e sequências potencializadoras, processamento de RNA eficiente; sinais como a splicing e sinais de poliadenilação (polyA); sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático; sequências que melhoram a eficiência da translação (por exemplo, sequência consenso Kozak); sequências que melhoram a estabilidade da proteína; e quando desejado, as sequências que melhoram a secreção do produto codificado. Um número de sequências de controle de expressão, incluindo promotores que são nativos, constitutivos, induzíveis e/ou específicos do tecido, são conhecidas na técnica e podem ser utilizadas.

[00084] Conforme usado aqui, uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, sequência de codificação) e sequências regulatórias são ditas como sendo “funcionalmente ligadas” quando elas são ligadas covalentemente de forma a colocar a expressão ou a transcrição da sequência de ácido nucleico sob a influência ou controle das sequências reguladoras. Caso seja desejado que as sequências de ácidos nucleicos sejam traduzidas em uma proteína funcional, duas sequências de DNA são ditas como sendo funcionalmente ligadas se a indução de um promotor nas sequências reguladoras 5' resultar na transcrição da sequência de codificação e se a natureza da ligação

entre as duas sequências de DNA não (1) resultam na introdução de uma mutação da mudança de estrutura, (2) interferem com a capacidade da região promotora para direcionar a transcrição de sequências de codificação, ou (3) interferem com a capacidade da transcrição de RNA correspondente para ser traduzida em uma proteína. Assim, uma região promotora seria funcionalmente ligada a uma sequência de ácido nucleico se a região promotora for capaz de afetar a transcrição da sequência de DNA de modo que a transcrição resultante possa ser traduzida para a proteína ou o polipeptídeo desejado. Da mesma forma duas ou mais regiões codificadoras são funcionalmente ligadas quando são ligadas de tal forma que sua transcrição de um promotor comum resulta na expressão de duas ou mais proteínas que tenham sido traduzidas na estrutura. Em algumas modalidades, as sequências de codificação funcionalmente ligadas produzem uma proteína de fusão. Em algumas modalidades, as sequências codificadoras funcionalmente ligadas produzem um RNA funcional (por exemplo, miRNA).

[00085] Em alguns aspectos, a descrição fornece um ácido nucleico isolado, compreendendo um transgene, em que o transgene compreende uma sequência de ácido nucleico codificando um ou mais microRNAs (por exemplo, miRNAs). Um "microRNA" ou "miRNA" é uma pequena molécula de RNA não codificante capaz de mediar o silenciamento gênico transcracional ou pós-translacional. Normalmente, o miRNA é transcrito como uma estrutura duplex em forma de grampo (hairpin) ou haste-alça (por exemplo, tendo uma estrutura principal de fita simples de autocomplementaridade), referida como um miRNA principal (pri-miRNA), que é processado enzimaticamente (por ex., por Drosha, DGCR8, Pasha, etc.) em um pré-miRNA. O comprimento de um pri-miRNA pode variar. Em algumas modalidades, um pri-miRNA varia de cerca de 100 a cerca de 5000 pares de base (por exemplo,

cerca de 100, cerca de 200, cerca de 500, cerca de 1000, cerca de 1200, cerca de 1500, cerca de 1800 ou cerca de 2000 pares de base) de comprimento. Em algumas modalidades, um pri-miRNA é maior do que 200 pares de bases de comprimento (por exemplo, 2500, 5000, 7000, 9000, ou mais pares de bases de comprimento).

[00086] Pre-miRNA, que também é caracterizado por uma estrutura duplex em forma de grampo (hairpin) ou haste-alça, também pode variar em comprimento. Em algumas modalidades, o pre-miRNA varia em tamanho de cerca de 40 pares de bases de comprimento a cerca de 500 pares de bases de comprimento. Em algumas modalidades, o pre-miRNA varia em tamanho de cerca de 50 a 100 pares de bases de comprimento. Em algumas modalidades, o pre-miRNA varia em tamanho de cerca de 50 para cerca de 90 pares de bases de comprimento (por exemplo, cerca de 50, cerca de 52, cerca de 54, cerca de 56, cerca de 58, cerca de 60, cerca de 62, cerca de 64, cerca de 66, cerca de 68, cerca de 70, cerca de 72, cerca de 74, cerca de 76, cerca de 78, cerca de 80, cerca de 82, cerca de 84, cerca de 86, cerca de 88 ou cerca de 90 pares de bases de comprimento).

[00087] Geralmente, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma, e enzimaticamente transformado por Dicer para primeiro produzir um miRNA/miRNA* duplex e, em seguida, uma molécula de miRNA madura de fita simples, que é posteriormente carregada para o complexo de silenciamento induzido pelo RNA (RISC). Tipicamente, uma molécula de miRNA madura varia em tamanho de cerca de 19 a cerca de 30 pares de bases de comprimento. Em algumas modalidades, uma molécula de miRNA madura varia de cerca de 19, cerca de 20, cerca de 21, cerca de 22, cerca de 23, cerca de 24, cerca de 25, cerca de 26, cerca de 27, cerca de 28, cerca de 29 ou 30 pares de base de comprimento. Em algumas modalidades, um ácido nucleico isolado da descrição compreende uma sequência codificando

um pri-miRNA, um pre-miRNA, ou um miRNA maduro, compreendendo uma sequência definida em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2-10 ou 21-22.

[00088] Deve ser entendido que um ácido nucleico isolado ou vetor (por exemplo, vetor de rAAV), em algumas modalidades, compreende uma sequência de ácido nucleico codificando mais do que um (por exemplo, uma pluralidade, como 2, 3, 4, 5, 10 ou mais) miRNAs. Em algumas modalidades, cada um dos mais de um miRNAs alvejam (por exemplo, se hibridiza ou se liga especificamente a) o mesmo gene-alvo (por exemplo, um ácido nucleico isolado codificando três miRNAs únicos, onde cada miRNA alveja o gene HTT). Em algumas modalidades, cada um dos mais de um miRNAs alveja (por exemplo, se hibridiza ou se liga especificamente a) um gene-alvo diferente.

[00089] Em alguns aspectos, a descrição fornece ácidos nucleicos isolados e vetores (por exemplo, vetores de rAAV) que codificam um ou mais miRNAs artificiais. Conforme usado neste documento "miRNA artificial" ou "amiRNA" refere-se a um pri-miRNA ou pre-miRNA endógeno (por ex., uma estrutura principal do miRNA, que é miRNA precursor capaz de produzir um miRNA funcional maduro), em que as sequências de miRNA e miRNA* (por exemplo, fita passageira do miRNA duplex) foram substituídas com as sequências correspondentes de amiRNA/amiRNA* que direcionam o silenciamento do RNA altamente eficiente do gene alvo, por exemplo, como descrito por Eamens et al. (2014), Methods Mol. Biol. 1062:211-224. Por exemplo, em algumas modalidades, um miRNA artificial compreende uma estrutura principal de miR-155 pri-miRNA em que uma sequência codificando um miRNA específico de HTT madura (por exemplo, qualquer uma das SEQ ID NOs: 2-10) foi inserido no lugar da sequência codificando o miRNA maduro do miR-155 endógeno. Em algumas modalidades, o miRNA (p.ex., um miRNA artificial) conforme

descrito pela descrição compreende uma sequência de estrutura principal miR-155, uma sequência de estrutura principal miR-30, uma sequência de estrutura principal mir-64 ou uma sequência de estrutura principal mir-122.

[00090] Uma região compreendendo um transgene (por exemplo, uma segunda região, terceira região, quarta região, etc.) pode ser posicionada em qualquer local adequado do ácido nucleico isolado. A região pode ser posicionada em qualquer porção não traduzida do ácido nucleico, incluindo, por exemplo, um ítron, região 5' ou 3' não traduzida, etc.

[00091] Em alguns casos, pode ser desejável posicionar a região (por exemplo, a segunda região, terceira região, quarta região, etc.) a montante do primeiro códon de uma sequência de ácido nucleico, codificando uma proteína (por exemplo, uma sequência codificadora da proteína). Por exemplo, a região pode ser posicionada entre o primeiro códon de uma sequência codificadora da proteína) e 2000 nucleotídeos a montante do primeiro códon. A região pode ser posicionada entre o primeiro códon de uma sequência codificadora da proteína e 1000 nucleotídeos a montante do primeiro códon. A região pode ser posicionada entre o primeiro códon de uma sequência codificadora da proteína e 500 nucleotídeos a montante do primeiro códon. A região pode ser posicionada entre o primeiro códon de uma sequência codificadora da proteína e 250 nucleotídeos a montante do primeiro códon. A região pode ser posicionada entre o primeiro códon de uma sequência codificadora da proteína e 150 nucleotídeos a montante do primeiro códon.

[00092] Em alguns casos (por exemplo, quando um transgene carece de uma sequência codificadora da proteína), pode ser desejável posicionar a região (por exemplo, a segunda região, terceira região, quarta região, etc.) a montante da cauda poli-A de um

transgene. Por exemplo, a região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 2000 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 1000 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 500 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 250 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 150 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 100 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 50 nucleotídeos a montante da primeira base. A região pode ser posicionada entre a primeira base de uma cauda poli-A e 20 nucleotídeos a montante da primeira base. Em algumas modalidades, a região é posicionada entre a última base do nucleotídeo de uma sequência promotora e a primeira base do nucleotídeo de uma sequência da cauda poli-A.

[00093] Em alguns casos, a região pode ser posicionada a jusante da última base da cauda poli-A de um transgene. A região pode estar entre a última base de uma cauda poli-A e uma posição 2000 nucleotídeos a jusante da última base. A região pode estar entre a última base de uma cauda poli-A e uma posição 1000 nucleotídeos a jusante da última base. A região pode estar entre a última base de uma cauda poli-A e uma posição 500 nucleotídeos a jusante da última base. A região pode estar entre a última base de uma cauda poli-A e uma posição 250 nucleotídeos a jusante da última base. A região pode estar entre a última base de uma cauda poli-A e uma posição 150 nucleotídeos a jusante da última base.

[00094] Deve ser apreciado que, nos casos em que um transgene codifica mais de um miRNA, cada miRNA pode ser posicionado em qualquer local adequado dentro do transgene. Por exemplo, um ácido nucleico codificando um primeiro miRNA pode ser posicionado em um íntron do transgene e uma sequência de ácido nucleico codificando um segundo miRNA pode ser posicionado em outra região não traduzida (por exemplo, entre o último códon de uma sequência codificadora da proteína e a primeira base da cauda poli-A do transgene).

[00095] Em algumas modalidades, o transgene comprehende ainda uma sequência de ácidos nucleicos codificando uma ou mais sequências de controle de expressão (p.ex., um promotor, etc). As sequências de controle de expressão incluem a iniciação da transcrição adequada, terminação, promotor e sequências potencializadoras, processamento de RNA eficiente; sinais como a splicing e sinais de poliadenilação (polyA); sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático; sequências que melhoram a eficiência da translação (por exemplo, sequência consenso Kozak); sequências que melhoram a estabilidade da proteína; e quando desejado, as sequências que melhoram a secreção do produto codificado. Um grande número de sequências de controle de expressão, incluindo promotores que são nativos, constitutivos, induzíveis e/ou específicos do tecido, são conhecidas na técnica e podem ser utilizadas.

[00096] Um "promotor" se refere a uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria sintética da célula ou maquinaria sintética introduzida, que são necessários para iniciar a transcrição específica de um gene. As frases "posicionado operacionalmente", "sob controle" ou "sob controle transcrional" significa que o promotor está no local e orientação corretas em relação ao ácido nucleico para controlar a iniciação do RNA polimerase e a expressão do gene.

[00097] Para as proteínas de codificação de ácidos nucleicos, uma

sequência de poliadenilação geralmente é inserida após as sequências de transgene e antes da sequência ITR de AAV 3'. Uma construção de rAAV útil na presente descrição também pode conter um íntron, localizado desejavelmente entre a sequência promotora/potencializadora e o transgene. Uma possível sequência íntron é derivada do SV-40, e é referida como sequência íntron SV-40 T. Outro elemento de vetor que pode ser usado é um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES). Uma sequência IRES é usada para produzir mais de um polipeptídeo a partir de uma única transcrição do gene. Uma sequência IRES seria usada para produzir uma proteína que contém mais de uma cadeia polipeptídica. A seleção destes e de outros elementos de vetor comuns são convencionais e muitas dessas sequências estão disponíveis [ver, por exemplo, Sambrook et al., e as referências citadas em, por exemplo, páginas 3.18 3.26 e 16.17 16.27 e Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989]. Em algumas modalidades, uma sequência do vírus 2A da febre aftosa é incluída na poliproteína; este é um pequeno peptídeo (aproximadamente 18 aminoácidos de comprimento) que foi mostrado para mediar a clivagem de poliproteínas (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; e Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). A atividade de clivagem da sequência 2A foi previamente demonstrada em sistemas artificiais incluindo plasmídeos e vetores de terapia gênica (AAV e retrovírus) (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; e Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; e Klump, H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

[00098] Exemplos de promotores constitutivos incluem, sem limitação, o promotor LTR do vírus do sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente com o potencializador RSV), o promotor do citomegalovírus (CMV) (opcionalmente com o potencializador CMV) [ver, por exemplo, Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)], o promotor SV40, o promotor diidrofolato redutase, o promotor β -actina, o promotor fosfoglicerol quinase (PGK) e o promotor EF1 α [Invitrogen]. Em algumas modalidades, um promotor é um promotor da β -actina de galinha melhorado. Em algumas modalidades, o promotor é um promotor U6.

[00099] Os promotores induzíveis permitem a regulação da expressão do gene e podem ser regulados por compostos exogenousamente fornecidos, fatores ambientais como temperatura, ou a presença de um estado fisiológico específico, por exemplo, fase aguda, um estado específico de diferenciação da célula ou em replicação de células apenas. Os promotores induzíveis e sistemas induzíveis estão disponíveis a partir de uma variedade de fontes comerciais, incluindo, sem limitação, Invitrogen, Clontech e Ariad. Muitos outros sistemas têm sido descritos e podem ser facilmente selecionados por um versado na técnica. Exemplos de promotores induzíveis regulados por promotores exogenousamente fornecidos inclui o promotor da metalotioneína (MT) em ovinos induzíveis por zinco, promotor do vírus do tumor mamário do camundongo (MMTV) induzível por dexametasona (Dex), o sistema promotor da polimerase T7 (WO 98/10088); o promotor do inseto ecdissone (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), o sistema repressível por tetraciclina (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), o sistema induzível por tetraciclina (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)). Ainda outros tipos de promotores induzíveis que podem ser úteis neste contexto são aqueles que são regulados por um estado fisiológico específico, por exemplo, temperatura, fase aguda, um determinado estado de diferenciação da célula ou em replicação de células apenas.

[000100] Em outra modalidade, o promotor nativo para o transgene será usado. O promotor nativo pode ser preferido quando for desejado que a expressão do transgene deva simular a expressão nativa. O promotor nativo pode ser usado quando a expressão do transgene deve ser regulada temporalmente ou em desenvolvimento ou de uma maneira específica de tecido ou em resposta a estímulos transpcionais específicos. Em outra modalidade, outros elementos de controle de expressão nativa, como elementos potencializadores, sítios de poliadenilação ou sequências de consenso Kozak também podem ser usados para simular a expressão nativa.

[000101] Em algumas modalidades, as sequências reguladoras conferem capacidades de expressão do gene específico do tecido. Em alguns casos, as sequências reguladoras específicas de tecido ligam os fatores de transcrição específicos do tecido que induzem a transcrição em forma específica de tecido. Essas sequências reguladoras específicas de tecido exemplificadoras incluem, mas não se limitam a, os seguintes promotor específico de tecido: um promotor de globulina ligadora de tiroxina (TBG) específico do fígado, um promotor de insulina, um promotor de glucagon, um promotor de somatostatina, um promotor do polipeptídeo pancreático (PPY), um promotor de sinapsina-1 (SYN), um promotor de creatina quinase

(MCK), um promotor de desmina (DES) de mamíferos, um promotor de α-miosina de cadeia pesada (α-MHC) ou um promotor de troponina T cardíaca (cTnT). Outros promotores exemplares incluem promotor beta-actina, promotor do núcleo do vírus da hepatite B, Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996); promotor alfa-fetoproteína (AFP), Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), promotor do osso osteocalcina (Stein et al, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); promotor do osso sialoproteína (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), promotor CD2 (Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998); promotor da cadeia pesada da imunoglobulina; promotor de cadeia α do receptor de células T, neuronal como promotor da enolase neurônio-específica (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), promotor do gene de cadeia leve de neurofilamento (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), e o promotor do gene vgf neurônio-específico (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995)), entre outros que serão visíveis para o versado na técnica.

[000102] Aspectos da descrição referem-se a um ácido nucleico isolado com mais de um promotor (por exemplo, 2, 3, 4, 5, ou mais promotores). Por exemplo, no contexto de uma construção com um transgene compreendendo uma primeira região codificando uma proteína e uma segunda região codificando um RNA inibitório (por exemplo, miRNA), pode ser desejável dirigir a expressão da região codificadora da proteína usando uma primeira sequência promotora (por exemplo, uma primeira sequência promotora ligada de maneira funcional à região codificadora da proteína), e para dirigir a expressão da região inibitória de codificação do RNA com uma segunda sequência promotora (por exemplo, uma segunda sequência promotora ligada de maneira funcional à região inibitória de codificação do RNA). Geralmente, a primeira sequência promotora e a

segunda sequência promotora pode ser a mesma sequência promotora ou diferentes sequências promotoras. Em algumas modalidades, a primeira sequência promotora (por exemplo, a expressão dirigida pelo promotor da região codificadora da proteína) é uma sequência promotora da RNA polimerase III (polIII). Exemplos não-limitantes de sequências promotoras polIII incluem sequências promotora de U6 e H1. Em algumas modalidades, a segunda sequência promotora (por exemplo, a expressão dirigida pela sequência promotora do RNA inibitório) é uma sequência promotora da RNA polimerase II (polII). Exemplos não-limitantes de sequências promotoras da polII incluem T7, T3, SP6, RSV e sequências promotoras do citomegalovírus. Em algumas modalidades, uma sequência promotora da polIII dirige a expressão de uma região codificadora inibitória do RNA (por exemplo, miRNA). Em algumas modalidades, uma sequência promotora da polII dirige a expressão de uma região codificadora da proteína.

[000103] Em algumas modalidades, o ácido nucleico compreende um transgene que codifica uma proteína. A proteína pode ser uma proteína terapêutica (por exemplo, um peptídeo, uma proteína ou um polipeptídeo útil para o tratamento ou prevenção de estados de doença em um indivíduo mamífero) ou uma proteína repórter. Em algumas modalidades, a proteína terapêutica é útil para o tratamento ou a prevenção da doença de Huntington, por exemplo, peptídeo de ligação à poliglutamina 1 (QBP1), PTD-QBP1, ED11, intracorpo C4, intracorpo VL12.3, intracorpo MW7, anticorpos Happ1, anticorpos Happ3, intracorpo mEM48, determinados anticorpos monoclonais (por exemplo, 1C2), e o peptídeo P42 e suas variantes, como descrito em Marelli et al. (2016) Orphanet Journal of Rare Disease 11:24; doi:10.1186/s13023-016-0405-3. Em algumas modalidades, as proteínas terapêuticas é proteína huntingtina do tipo selvagem (por

exemplo, a proteína huntingtina tendo uma região de repetição PolyQ compreendendo menos de 36 repetições).

[000104] Sem o desejo de se vincular a qualquer teoria específica, o silenciamento alelo específico da huntingtina mutante (HTT) pode fornecer um melhor perfil de segurança em um indivíduo em comparação ao silenciamento não-alelo específico (por exemplo, silenciamento dos dois alelos da HTT mutante e do tipo selvagem) porque a expressão e a função da HTT do tipo selvagem é preservada nas células. Aspectos da invenção referem-se ao reconhecimento e valorização dos inventores que os ácidos nucleicos isolados e vetores que incorporam uma ou mais sequências de RNA inibitórias (por exemplo, miRNA) visando o gene HTT em uma maneira alelo-específica enquanto dirige a expressão do gene HTT do tipo selvagem endurecido (gene HTT do tipo selvagem que não é alvo do miRNA) são capazes de alcançar a inativação da HTT mutante concomitante, por exemplo, no tecido do SNC, com expressão aumentada da HTT do tipo selvagem. Geralmente, a sequência do ácido nucleico codificando os mRNAs de HTT mutante e do tipo selvagem endógenos e o ácido nucleico do transgene codificando o mRNA de HTT do tipo selvagem "endurecido" são suficientemente diferentes de tal forma que o mRNA transgene da HTT do tipo selvagem "endurecido" não é alvejado por um ou mais RNAs inibitórios (por exemplo, miRNAs). Isso pode ser alcançado, por exemplo, introduzindo uma ou mais mutações silenciosas na sequência do transgene da HTT, que codifica a mesma proteína como o gene HTT do tipo selvagem endógeno, mas tem uma sequência diferente do ácido nucleico. Neste caso, o mRNA exógeno pode ser referido como "endurecido". Como alternativa, o RNA inibitório (por exemplo, miRNA) pode direcionar as regiões 5' e/ou 3' não traduzidas do mRNA HTT do tipo selvagem endógeno. Estas regiões 5' e/ou 3' podem então ser removidas ou substituídas no

mRNA do transgene de modo que o mRNA do transgene não seja alvo de um ou mais RNAs inibitórios.

[000105] As sequências repórter (p.ex, sequências de ácido nucleico codificando uma proteína repórter) que podem ser fornecidas em um transgene incluem, sem limitação, sequências de DNA que codificam β -lactamase, β -galactosidase (LacZ), fosfatase alcalina, timidina quinase, proteína verde fluorescente (GFP), cloranfenicol-acetiltransferase (CAT), luciferase e outras bem conhecidas na técnica. Quando associado com elementos de regulamentação que impulsionam a sua expressão, as sequências repórteres fornecem sinais detectáveis por meios convencionais, incluindo ensaios enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescência ou outros ensaios espectrográficos, ensaios de separação de células de ativação fluorescente e ensaios imunológicos, incluindo ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e imuno-histoquímica. Por exemplo, onde a sequência marcadora é o gene LacZ, a presença do vetor transportando o sinal é detectado por ensaios de atividade de β -galactosidase. Onde o transgene é a proteína verde fluorescente ou luciferase, o vetor transportando o sinal pode ser medido visualmente pela cor ou produção de luz em um luminômetro. Esses repórteres podem, por exemplo, ser úteis na verificação das capacidades alvo específicas do tecido e atividade de regulação do promotor específico do tecido de um ácido nucleico.

Vírus adeno-associado recombinantes (rAAVs)

[000106] Em alguns aspectos, a descrição fornece AAVs isolados. Conforme usado aqui em relação aos AAVs, o termo "isolado" se refere a um AAV que tenha sido obtido ou produzido artificialmente. Os AAVs isolados podem ser produzidos utilizando métodos recombinantes. Tais AAVs são referidos aqui como "AAVs recombinantes". AAVs recombinantes (rAAVs) preferencialmente têm

capacidades alvo específicas do tecido, de modo que uma nuclease e/ou um transgene de rAAV será entregue especificamente a um ou mais tecido(s) predeterminado(s). O capsídeo de AAV é um elemento importante para a determinação destas capacidades alvo específicas do tecido. Assim, um rAAV tendo um capsídeo apropriado para o tecido sendo o alvo pode ser selecionado.

[000107] Os métodos de obtenção de AAVs recombinantes tendo uma proteína do capsídeo desejada são bem conhecidos na técnica. (Ver, por exemplo, US 2003/0138772), os conteúdos dos quais estão aqui incorporados por referência na sua totalidade). Tipicamente, os métodos envolvem a cultura de uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína do capsídeo de AAV; um gene rep funcional; um vetor recombinante de AAV composto de repetições terminal invertida (ITR) do AAV e um transgene; e funções ajudantes suficientes para permitir a embalagem do vector recombinante de AAV nas proteínas do capsídeo de AAV. Em algumas modalidades, as proteínas do capsídeo são proteínas estruturais codificadas pelo gene cap de um AAV. Os AAVs compreendem três proteínas do capsídeo, proteínas vírion 1 a 3 (nomeadas VP1, VP2 e VP3), todas as quais são transcritas a partir de um único gene cap através do splicing alternativo. Em algumas modalidades, os pesos moleculares de VP1, VP2 e VP3 são respectivamente cerca de 87 kDa, cerca de 72 kDa e cerca de 62 kDa. Em algumas modalidades, mediante tradução, as proteínas do capsídeo formam um envoltório de proteína esférica de 60-mer em torno do genoma viral. Em algumas modalidades, as funções das proteínas do capsídeo são para proteger o genoma viral, entregar o genoma e interagir com o hospedeiro. Em alguns aspectos, as proteínas do capsídeo entregam o genoma viral a um hospedeiro em uma forma específica de tecido.

Em algumas modalidades, uma proteína do capsídeo de AAV é de um sorotipo de AAV selecionado do grupo consistindo de AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AA VRh8, AAV9 e AAV10. Em algumas modalidades, uma proteína do capsídeo de AAV é de um sorotipo derivado de um primata não humano, por exemplo, sorotipo de AA VRh8. Em algumas modalidades, uma proteína de capsídeo de AAV é de um sorotipo AAV9. Em algumas modalidades, a proteína do capsídeo de AAV compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 20.

[000108] Os componentes a serem cultivados na célula do hospedeiro para empacotar um vetor de rAAV em um capsídeo de AAV podem ser fornecidos à célula hospedeira na trans. Alternativamente, qualquer um ou mais dos componentes necessários (por exemplo, vetor recombinante de AAV, sequências rep, sequências pac e/ou funções ajudantes) pode ser fornecido por uma célula hospedeira estável que tenha sido projetada para conter um ou mais dos componentes necessários usando métodos conhecidos pelos versados na técnica. Mais adequadamente, tal célula hospedeira estável irá conter o(s) componente(s) necessário(s) sob o controle de um promotor induzível. No entanto, o(s) componente(s) necessário(s) podem estar sob o controle de um promotor constitutivo. Exemplos de promotores adequado induzíveis e constitutivos são fornecidos aqui, na discussão de elementos reguladores adequados para uso com o transgene. Em ainda outra alternativa, uma célula hospedeira estável selecionada pode conter componente(s) selecionado(s) sob o controle de um promotor constitutivo e outro(s) componente(s) selecionado(s) sob o controle de uma ou mais promotores induzíveis. Por exemplo, uma célula hospedeira estável pode ser gerada que é derivada de células 293 (que contêm funções ajudantes E1 sob o controle de um promotor constitutivo), mas que contém as proteínas rep e/ou cap sob

o controle de promotores induzíveis. Ainda outras células hospedeiras estáveis podem ser geradas por um profissional versado na técnica.

[000109] Em algumas modalidades, a descrição instantânea refere-se a uma célula hospedeira contendo um ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação codificando uma proteína (por exemplo, proteína huntingtina do tipo selvagem, opcionalmente proteína huntingtina do tipo selvagem "endurecida"). Em algumas modalidades, a divulgação instantânea refere-se a uma composição compreendendo a célula hospedeira descrita acima. Em algumas modalidades, uma composição compreendendo a célula hospedeira acima compreende um criopreservador.

[000110] O vetor recombinante de AAV, as sequências rep, sequências pac e funções auxiliares necessárias para produzirem o rAAV da descrição podem ser entregues para a embalagem da célula hospedeira usando qualquer elemento genético apropriado (vetor). O elemento genético selecionado pode ser entregue por qualquer método adequado, incluindo aqueles descritos aqui. Os métodos usados para construir qualquer modalidade dessa divulgação são conhecidos para aqueles com especialidade em manipulação de ácido nucleico e incluem a engenharia genética engenharia recombinante e técnicas sintéticas. Ver, por exemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Da mesma forma, os métodos para gerar os vírions de rAAV são bem conhecidos e a seleção de um método adequado não é uma limitação da presente descrição. Ver, por exemplo, K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993) e patente U.S. No. 5.478.745.

[000111] Em algumas modalidades, os AAVs recombinantes podem ser produzidos utilizando o método de transfecção tripla (descrito em detalhe na patente US No. 6.001.650). Normalmente, os AAVs recombinantes são produzidos pela transfecção de uma célula

hospedeira com um vetor recombinante de AAV (compreendendo um transgene) para ser embalados em partículas de AAV, um vetor função auxiliar de AAV e um vetor de função acessório. Um vetor função auxiliar de AAV codifica a "função auxiliar de AAV" (isto é, rep e cap), que funcionam em trans para replicação de AAV produtiva e encapsidação. De preferência, o vetor da função auxiliar do AAV suporta a produção eficiente do vetor de AAV sem gerar quaisquer vírions de AAV do tipo selvagem detectáveis (pisto é, vírions de AAV contendo os genes rep e cap funcionais). Exemplos não-limitantes de vetores adequados para utilização com a presente descrição incluem pHLP1, descrito na patente US N° 6.001.650 e o vetor pRep6cap6, descrito na patente US nº 6.156.303, cuja descrição está aqui incorporada por referência. A vetor da função acessória codifica as sequências de nucleotídeos para as funções virais não derivadas de AAV e/ou celulares sobre o qual o AAV é dependente de replicação (isto é, "funções acessórias"). As funções acessórias incluem as funções necessárias para a replicação de AAV, incluindo, sem limitação, as porções envolvidas na ativação da transcrição do gene de AAV, splicing do mRNA de AAV específico do estágio, replicação do DNA de AAV, síntese dos produtos de expressão cap e conjunto do capsídeo de AAV. As funções acessórias baseadas em virais podem ser derivadas a partir de qualquer um dos vírus auxiliares conhecidos como o adenovírus, herpesvírus (excepto vírus herpes simplex tipo 1), e vírus vaccínia.

[000112] Em alguns aspectos, a descrição fornece célula hospedeira transfetadas. O termo "transfecção" é usado para se referir à absorção de DNA estranho por uma célula e uma célula foi "transfetada" quando o DNA exógeno foi introduzido no interior da membrana celular. Um número de técnicas de transfecção são geralmente conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Graham et al.

(1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, e Chu et al. (1981) Gene 13:197. Essas técnicas podem ser usadas para introduzir um ou mais ácidos nucleicos exógenos, como um vetor de integração de um nucleotídeo e outras moléculas de ácido nucleico, em células hospedeiras adequadas.

[000113] Uma "célula hospedeira" se refere a qualquer célula que abriga, ou é capaz de abrigar, uma substância de interesse. Muitas vezes uma célula hospedeira é uma célula mamíferos. Uma célula hospedeira pode ser utilizada como um receptor de uma construção auxiliar de AAV, um plasmídeo minigene de AAV, um vetor de função acessória ou outro DNA associado à produção de AAVs recombinantes. O termo inclui os descendentes da célula original que foram transfectadas. Assim, uma "célula hospedeira" como usado aqui pode se referir a uma célula que foi transfectada com uma sequência de DNA exógeno. Fica entendido que a descendência de uma única célula parental pode não ser necessariamente completamente idêntica na morfologia ou no complemento do DNA genômico ou total como o parente original, devido a mutação natural, acidental ou deliberada.

[000114] Conforme usado aqui, o termo "linhagem celular" se refere a uma população de células capazes de crescimento contínuo ou prolongado e divisão in vitro. Muitas vezes, as linhagens celulares são populações clonais derivadas de uma única célula progenitora. Sabe-se ainda que alterações espontâneas ou induzidas podem ocorrer em cariotipos durante o armazenamento ou transferência de tais populações clonais. Portanto, as células derivadas da linhagem celular referidas podem não ser precisamente idênticas à células ou culturas ancestrais e a linhagem celular referida inclui tais variantes.

[000115] Conforme usado aqui, os termos "célula recombinante" se

refere a uma célula em que um segmento de DNA exógeno, como segmento de DNA que leva à transcrição de um polipeptídeo biologicamente ativo ou produção de um ácido nucleico biologicamente ativo como um RNA, foi introduzido.

[000116] Conforme usado aqui, o termo "vetor" inclui qualquer elemento genético, como um plasmídeo, fago, transpóson, cosmídeo cromossomo, cromossomo artificial, vírus, vírion, etc, que é capaz de replicação quando associado com os elementos de controle adequado e que pode transferir as sequências de genes entre as células. Assim, o termo inclui a clonagem e a expressão de veículos, bem como vetores virais. Em algumas modalidades, os vectores úteis estão contemplados para ser aqueles vetores em que o segmento de ácido nucleico para ser transcrito é posicionado sob o controle transcracional de um promotor. Um "promotor" se refere a uma sequência de DNA reconhecida pela maquinaria sintética da célula ou maquinaria sintética introduzida, que são necessários para iniciar a transcrição específica de um gene. As frases "posicionado operacionalmente", "sob controle" ou "sob controle transcracional" significa que o promotor está no local e orientação corretas em relação ao ácido nucleico para controlar a iniciação do RNA polimerase a e a expressão do gene. O termo "vetor ou construção de expressão" significa qualquer tipo de construção genética que contém um ácido nucleico em que uma parte ou a totalidade da sequência de codificação do ácido nucleico é capaz de ser transcrita. Em algumas modalidades, a expressão inclui a transcrição do ácido nucleico, por exemplo, para gerar um produto de polipeptídeo biologicamente ativo ou RNA funcional (por exemplo, RNA guia) a partir de um gene transcrito.

[000117] Os métodos supracitados para embalagem de vetores recombinantes em capsídeos de AAV desejados para produzir os rAAVs da descrição não são limitantes e outros métodos adequados

serão evidentes para os versados na técnica.

[000118] Em algumas modalidades, qualquer um ou mais nucleotídeos timidina (T) ou nucleotídeos uridina (U) em uma sequência fornecida aqui, incluindo uma sequência fornecida na listagem de sequências, pode ser substituído por qualquer outro nucleotídeo adequado para emparelhamento de bases (por exemplo, através de um par de base Watson-Crick) com um nucleotídeo adenosa. Por exemplo, em algumas modalidades, qualquer um ou mais nucleotídeos timidina (T) em uma sequência fornecida aqui, incluindo uma sequência fornecida na listagem de sequências, pode ser adequadamente substituído por um nucleotídeo uridina (U) ou vice-versa.

Modos de administração

[000119] Os rAAVs da descrição podem ser entregues a um indivíduo em composições de acordo com quaisquer métodos adequados conhecidas na técnica. Por exemplo, um rAAV, preferencialmente em suspensão em um carreador fisiologicamente compatível (isto é, em uma composição), pode ser administrado a um indivíduo, isto é, animal hospedeiro, como um ser humano, camundongo, rato, gato, cão, ovelha, coelho, cavalo, vaca, cabra, suíno, cobaia, hamster, frango, peru, ou um primata não humano (por exemplo, chimpazé). Em algumas modalidades um animal hospedeiro não inclui um humano.

[000120] A entrega dos rAAVs a um indivíduo mamífero pode ser, por exemplo, por injeção intramuscular ou pela administração na corrente sanguínea dos indivíduos mamíferos. A administração na corrente sanguínea pode ser pela injeção em uma veia, uma artéria ou qualquer outro conduto vascular. Em algumas modalidades, os rAAVs são administrados na corrente sanguínea através de perfusão do membro isolado, uma técnica bem conhecida na técnica cirúrgica, o

método essencialmente permitindo ao versado na técnica isolar um membro da circulação sistêmica antes da administração dos vírions de rAAV. Uma variante da técnica de perfusão do membro isolado, descrita na patente US N° 6.177.403, também pode ser utilizada pelo versado na técnica para administrar os vírions na vasculatura de um membro isolado para potencialmente aumentar a transdução em células musculares ou do tecido. Além disso, em certos casos, pode ser desejável entregar os vírions ao SNC de um indivíduo. Por "SNC" se entende todas as células e os tecidos do cérebro e da medula espinhal de um vertebrado. Assim, o termo inclui, mas não está limitado a, células neuronais, células gliais, astrócitos, líquido cefalorraquidiano (LCR), espaços intersticiais, osso, cartilagem e similares. Os AAVs recombinantes podem ser entregues diretamente ao SNC ou cérebro por injeção em, por exemplo, região ventricular, bem como estriado (por exemplo, o núcleo caudado ou putâmen do estriado), medula espinhal e junção neuromuscular ou lóbulo cerebelar, com uma agulha, cateter ou dispositivo relacionado, usando técnicas neurocirúrgicas conhecidas na técnica, como por injeção estereotáxica (ver, por exemplo, Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; e Alisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000). Em algumas modalidades, o rAAV como descrito na descrição é administrado por injeção intravenosa. Em algumas modalidades, o rAAV é administrado por injeção intracerebral. Em algumas modalidades, o rAAV é administrado por injeção intratecal. Em algumas modalidades, o rAAV é administrado por injeção intrastriatal. Em algumas modalidades, o rAAV é administrado por injeção intracraniana. Em algumas modalidades, o rAAV é administrado por injeção de cisterna magna. Em algumas modalidades, o rAAV é administrado por injeção de ventrículo lateral

cerebral.

[000121] Aspectos da descrição instantânea referem-se a composições compreendendo um AAV recombinante constituído por uma proteína do capsídeo e um ácido nucleico codificando um transgene, em que o transgene compreende uma sequência de ácido nucleico codificando um ou mais miRNAs. Em algumas modalidades, cada miRNA compreende uma sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2-10. Em algumas modalidades, o ácido nucleico inclui ainda ITRs do AAV. Em algumas modalidades, cada rAAV compreende um vetor de rAAV representado pela sequência apresentada em qualquer uma das SEQ ID NOs: 16-19, ou uma porção do mesmo. Em algumas modalidades, uma composição inclui ainda um carreador farmacologicamente aceitável.

[000122] As composições da descrição podem incluir um rAAV sozinho ou em combinação com um ou mais outros vírus (por exemplo, uma segunda codificação de rAAV tendo um ou mais diferentes transgenes). Em algumas modalidades, uma composição compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais rAAVs diferentes cada um tendo um ou mais transgene diferente.

[000123] Os carreadores adequados podem ser prontamente selecionados por um versado na técnica tendo em vista a indicação de que o rAAV é direcionado. Por exemplo, um carreador adequado inclui solução fisiológica, que pode ser formulada com uma variedade de soluções tampão (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato). Outros carreadores exemplares incluem solução salina, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrano, ágar, pectina, óleo de amendoim, óleo de gergelim e água. A seleção do carreador não é uma limitação da presente descrição.

[000124] Opcionalmente, as composições de descrição podem conter, além do rAAV e carreador(es), outros ingredientes

farmacêuticos convencionais, como conservantes ou estabilizadores químicos. Conservantes adequados exemplificadores incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol e paraclorofenol. Estabilizadores químicos adequados incluem gelatina e albumina.

[000125] O rAAVs são administrados em quantidades suficientes para transfectar as células de um tecido desejado e para fornecer níveis suficientes de transferência de genes e expressão sem efeitos adversos. Vias de administração convencionais e farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não estão limitadas a, entrega direta ao órgão selecionado (por exemplo, entrega intraportal ao fígado), oral, inalação (incluindo entrega intranasal e intratraqueal), intra-ocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, intratumoral e outras vias parentais de administração. Vias de administração que podem ser combinadas, se desejado.

[000126] A dose de vírions de rAAV necessária para alcançar um determinado "efeito terapêutico", por exemplo, as unidades de dose em cópias do genoma/por quilograma de peso corporal (GC/kg), irá variar com base em vários fatores incluindo, mas não limitados a: a rota de administração do vírion de rAAV, o nível do gene ou a expressão do RNA necessária para obter um efeito terapêutico, a doença específica ou distúrbio sendo tratado, e a estabilidade do gene ou produto de RNA. Um dos versados na técnica podem facilmente determinar um intervalo de dose do vírion de rAAV para tratar um paciente com uma determinada doença ou distúrbio com base em fatores supramencionados, bem como outros fatores que são bem conhecidos na técnica.

[000127] Uma quantidade eficaz de um rAAV é uma quantidade suficiente para infectar um animal, alvo um tecido desejado. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de um rAAV é uma

quantidade suficiente para produzir um modelo de animal transgênico somático estável. A quantidade eficaz dependerá sobretudo de fatores como espécie, idade, peso, saúde do indivíduo e o tecido a ser direcionado e podem assim variar entre animal e tecido. Por exemplo, uma quantidade eficaz do rAAV é geralmente na faixa de cerca de 1 ml para cerca de 100 ml de solução contendo cerca de 10⁹ a 10¹⁶ cópias do genoma. Em alguns casos, a dosagem entre cerca de 10¹¹ a 10¹³ cópias do genoma de rAAV é adequada. Em certas modalidades, 10¹² ou 10¹³ cópias do genoma de rAAV é eficaz para direcionar o tecido do SNC. Em alguns casos, animais transgênicos estáveis são produzidos por múltiplas doses de um rAAV.

[000128] Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que uma vez por semana (por exemplo, um período de 24 horas). Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que uma vez por 2, 3, 4, 5, 6, ou 7 dias por semana. Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que uma vez por semana (por exemplo, 7 dias por semana). Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que quinzenalmente (por exemplo, uma vez em período de duas semanas). Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que uma vez por mês (por exemplo, uma vez em um período de 30 dias). Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que uma vez por um período de seis meses. Em algumas modalidades, uma dose de rAAV é administrada a um indivíduo não mais do que uma vez por ano (por exemplo, 365 dias ou 366 em um ano bissexto).

[000129] Em algumas modalidades, composições de rAAV são formuladas para reduzir a agregação de partículas de AAV na

composição, especialmente quando as concentrações altas de rAAV estão presentes (por exemplo, ~1013 GC/ml ou mais). Métodos de redução da agregação de rAAVs são bem conhecidos na técnica e, incluem, por exemplo, além dos tensoativos, o ajuste do pH e ajuste da concentração de sal, etc (Ver, por exemplo, Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171–178, o conteúdo do qual é aqui incorporado por referência).

[000130] Formulação de excipientes farmacologicamente aceitáveis e soluções do carreador são bem conhecidas pelos versados na técnica, como é o desenvolvimento da dosagem adequada e regimes de tratamento para usar as composições determinadas descritas aqui em uma variedade de regimes de tratamento.

[000131] Normalmente, estas formulações podem conter pelo menos cerca de 0,1% do composto ativo ou mais, embora o percentual de ingrediente ativo(s) possa, evidentemente, ser variado e pode ser convenientemente entre cerca de 1 ou 2% e cerca de 70% ou 80% ou mais do peso ou do volume da formulação total. Naturalmente, a quantidade de compostos ativo em cada composição terapeuticamente útil pode ser preparada em uma forma que uma dosagem adequada será obtida em qualquer unidade da dose do composto. Fatores como solubilidade, biodisponibilidade, meia-vida biológica, via de administração, prazo de validade do produto, bem como outras considerações farmacológicas serão contemplados por um versado na técnica de preparação de tais formulações farmacêuticas, e como tal, uma variedade de doses e regimes de tratamento pode ser desejável.

[000132] Em certas circunstâncias, será desejável entregar as construções terapêuticas com base em rAAV em composições farmacêuticas adequadamente formuladas divulgadas aqui quer por via subcutânea, intra pancreaticamente, intranasal, parenteral, intravenosa, intramuscular, intracecal ou oralmente, intraperitoneal ou

por inalação. Em algumas modalidades, as modalidades de administração são como descritas na patente US Nos 5.543.158; 5.399.363 e 5.641.515 (cada especificamente aqui incorporada por referência em sua totalidade) podem ser usadas para entregar os rAAVs. Em algumas modalidades, um modo preferido de administração é por injeção pela veia porta.

[000133] As formas farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. As dispersões podem também ser preparadas em glicerol, polietilenoglicóis líquidos e suas misturas e em óleos. Sob condições normais de armazenamento e de utilização, estas preparações contêm um conservante para evitar o crescimento de microrganismos. Em muitos casos a forma é estéril e fluida na medida em que existe uma seringabilidade fácil. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e de armazenamento e deve ser preservada contra a contaminação de microrganismos, tais como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietileno glicol líquido e similares), misturas adequadas dos mesmos e/ou óleos vegetais. A boa fluidez pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho das partículas necessárias no caso de dispersão e pelo uso dos tensoativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser provocada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal e afins. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser provocada pelo uso na composição de agentes que atrasam a absorção, por exemplo, monoestearato de

alumínio e gelatina.

[000134] Para administração de uma solução aquosa injetável, por exemplo, a solução pode ser convenientemente tamponada, se necessário, e o diluente líquido primeiro renderizado isotônico com solução salina isotônica suficiente ou glicose. Estas soluções aquosas específicas são especialmente adequadas para administração endovenosa, intramuscular, subcutânea e intraperitoneal. Neste contexto, um meio aquoso estéril que pode ser empregado será conhecido por aqueles versados na técnica. Por exemplo, uma dosagem poderá ser dissolvida em 1 ml de solução salina isotônica e adicionada para 1000 ml de fluido hipodermóclise ou injetada no local proposto de infusão, (ver por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 e 1570-1580). Alguma variação de dosagem irá necessariamente ocorrer dependendo da condição do hospedeiro. A pessoa responsável pela administração irá, em qualquer caso, determinar a dose adequada para o hospedeiro individual.

[000135] As soluções injetáveis estéreis são preparadas pela incorporação do rAAV ativo na quantidade necessária no solvente apropriado com vários de outros ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização de filtro. Geralmente, as dispersões são preparadas ao incorporar os vários ingredientes ativos esterilizados em um veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e técnicas de congelamento que produzem um pó do ingrediente ativo e qualquer ingrediente desejado adicional a partir de uma solução previamente esterilizada e filtrada do mesmo.

[000136] As composições de rAAV divulgadas aqui podem também

ser formuladas em uma forma neutra ou de sal. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos de aminoácidos livres da proteína) e são formados com ácidos inorgânicos como, por exemplo, ácido clorídrico ou fosfórico, ou como ácidos orgânicos, como acético, oxálico, tartárico, mandélico e similares. Os sais formados com os grupos carboxilos livres também podem ser derivados de bases inorgânicas, como, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio, ou hidróxidos férricos, e tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína e similares. Mediante a formulação, as soluções serão administradas de forma compatível com a formulação de dosagem e em tal quantidade que seja terapeuticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem como soluções injetáveis, cápsulas de liberação de fármaco e similares.

[000137] Conforme usado aqui, "carreador" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, isotônicos e agentes retardadores de absorção, tampões, soluções carreadoras, suspensões, coloides e afins. A utilização de tais meios e agentes para as substâncias farmaceuticamente ativas é bem conhecida na técnica. Os ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. A frase "farmacologicamente aceitável" se refere a entidades moleculares e composições que não produzam uma reação alérgica ou semelhante adversa quando administradas a um hospedeiro.

[000138] Os veículos de aplicação como lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lipídios, vesículas e similares, podem ser utilizados para a introdução das composições da presente descrição em células hospedeiras adequadas. Em especial, o

vetor de rAAV que entrega os transgenes pode ser formulado para entregar encapsulada em uma partícula lipídica, um lipossoma, uma vesícula, um nanosfera, ou uma nanopartícula ou similares.

[000139] Essas formulações podem ser preferidas para a introdução de formulações farmacologicamente aceitáveis dos ácidos nucleicos ou construções de rAAV divulgadas aqui. A formação e o uso de lipossomas são geralmente conhecidos por aqueles versados na técnica. Recentemente, os lipossomas foram desenvolvidos com melhor estabilidade de soro e circulação de meia vidas (Patente US No. 5.741.516). Além disso, vários métodos de lipossoma e preparações do tipo lipossoma como potenciais carreadores de fármacos têm sido descritos (Patente US Nos. 5.567.434; 5.552.157; 5.565.213; 5.738.868 e 5.795.587).

[000140] Os lipossomas têm sido usados com sucesso com um certo número de tipos de células que normalmente são resistentes a transfecção através de outros procedimentos. Além disso, os lipossomas são livres de restrições de comprimento de DNA que são sistemas de distribuição típicos ou baseados em viral. Os lipossomas têm sido utilizados de forma eficaz para introduzir genes, fármacos, agentes radioterapêuticos, vírus, fatores de transcrição e efetores alostéricos em uma variedade de linhagens de células cultivadas e animais. Além disso, vários ensaios clínicos bem-sucedidos examinando a eficácia da distribuição do fármaco mediado pelo lipossoma foram concluídos.

[000141] Os lipossomas são formados a partir de fosfolipídios que se encontram dispersos em meio aquoso e espontaneamente formam vesículas bicamadas concêntricas multilamelares (também denominado vesículas multilamelares (MLVs). As MLVs geralmente têm diâmetros de 25 nm a 4 µm. A sonicação de MLVs resulta na formação de pequenas vesículas unilamelares (SUVs) com diâmetros

na faixa de 200 a 500 Å, contendo uma solução aquosa no núcleo.

[000142] Alternativamente, as formulações de nanocápsulas do rAAV podem ser usadas. As nanocápsulas podem geralmente aprisionar substâncias em uma maneira estável e reprodutível. Para evitar os efeitos colaterais devido a sobrecarga polimérica intracelular, tais partículas ultrafinas (médias em torno de 0,1 µm) devem ser projetadas usando polímeros capazes de ser degradados in vivo. As nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradáveis que atendem a esses requisitos são contempladas para uso.

[000143] Além dos métodos de entrega descritos acima, as seguintes técnicas são também contempladas como métodos alternativos de fornecimento das composições de rAAV para um hospedeiro. Sonoforese (ou seja, ultra-som) tem sido utilizado e descrito na patente US N° 5.656.016 como um dispositivo para melhorar a taxa e a eficácia da permeação do fármaco em e através do sistema circulatório. Outras alternativas de entrega de fármacos contempladas são injeção intraóssea (Patente US N° 5.779.708), dispositivos de microchip (Patente US N° 5.797.898), formulações oftálmicas (Bourlais et al, 1998), matrizes transdérmicas (Patente US N°s 5.770.219 e 5.783.208) e entrega controlada por feedback (Patente US No. 5.697.899).

Kits e composições relacionadas

[000144] Os agentes descritos aqui podem, em algumas modalidades, ser montados em kits farmacêuticos ou de diagnóstico ou de pesquisa para facilitar a sua utilização em aplicações terapêuticas, de diagnóstico ou de pesquisa. Um kit pode incluir um ou mais recipientes abrigando componentes da descrição e as instruções de utilização. Especificamente, esses kits podem incluir um ou mais agentes descritos aqui, junto com instruções descrevendo a aplicação pretendida e a correta utilização desses agentes. Em certas

modalidades, os agentes em um kit podem estar em uma formulação farmacêutica e dosagem adequada para uma aplicação em particular e para um método de administração de agentes. Kits para fins de pesquisa podem conter os componentes em concentrações adequadas ou quantidades para a execução de diversas experiências.

[000145] Em algumas modalidades, a descrição instantânea refere-se a um kit para produzir um rAAV, o kit compreendendo um recipiente abrigando um ácido nucleico isolado, compreendendo um miRNA compreendendo ou codificado pela sequência definida em qualquer uma das SEQ ID NOs: 2-10. Em algumas modalidades, o kit compreende ainda um recipiente abrigando um ácido nucleico isolado codificando uma proteína do capsídeo de AAV, por exemplo, uma proteína do capsídeo de AAV9.

[000146] O kit pode ser projetado para facilitar o uso dos métodos descritos aqui por pesquisadores e pode assumir muitas formas. Cada uma das composições do kit, onde aplicável, pode ser fornecida em forma líquida (por exemplo, em solução), ou em forma sólida, (por exemplo, um pó seco). Em determinados casos, algumas das composições podem ser constituíveis ou processáveis (por exemplo, de uma forma ativa), por exemplo, pela adição de um solvente adequado ou outras espécies (por exemplo, água ou um meio de cultura de células), que pode ou não ser fornecido com o kit. Conforme usado aqui, as "instruções" podem definir um componente de instrução e/ou promoção, e normalmente envolvem instruções escritas sobre ou associadas com as embalagens da descrição. As instruções também podem incluir quaisquer instruções eletrônicas ou orais fornecidas em qualquer forma que um usuário irá reconhecer claramente que as instruções são para ser associadas com o kit, por exemplo, audiovisual (por exemplo, vídeo, DVD, etc), Internet e/ou comunicações baseadas na web, etc. As instruções escritas podem ser em um formulário

prescrito por um organismo governamental regulando a fabricação, utilização ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujas instruções podem também refletir a aprovação pela agência da fabricação, utilização ou venda para a administração de animais.

[000147] O kit pode conter qualquer um ou mais dos componentes descritos aqui em um ou mais recipientes. Como um exemplo, em uma modalidade, o kit pode incluir instruções para a mistura de um ou mais componentes do kit e/ou para isolar e misturar uma amostra e aplicar a um indivíduo. O kit pode incluir um recipiente que abriga os agentes descritos aqui. Os agentes podem ser sob a forma de um líquido, sólido ou gel (em pó). Os agentes podem ser preparados esterilmente, embalados em seringa e enviados refrigerados. Como alternativa pode ser alojado em um frasco ou outro recipiente para armazenamento. Um segundo recipiente pode ter outros agentes preparados esterilmente. Alternativamente o kit pode incluir os agentes ativos pré-misturados e enviados em uma seringa, frasco, tubo ou outro recipiente.

[000148] Modalidades exemplares da invenção serão descritas em mais detalhes pelos Exemplos a seguir. Essas modalidades são exemplares da invenção, que um versado na técnica irá reconhecer não é limitado às modalidades exemplares.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Materiais e métodos

Culturas celulares e ensaios de triagem

[000149] As células HeLa foram mantidas em meio DMEM, glicose alta com SFB inativado pelo calor a 10% e de penicilina estreptomicina a 1% (ThermoFisher). Vinte e quatro horas antes da transfecção, as células foram semeadas em placas de 6 poços a $0,8\text{-}1,0 \times 10^6$ células/poço. No dia da transfecção, o crescimento médio foi substituído com 1,6 ml de Opti-MEM (ThermoFisher). Os plasmídeos

foram transfectados com 2 µl/poço de DharmaFECT Duo (Dharmacon). Cada poço recebeu 0,6 µg de DNA plasmidial. Quarenta e oito horas após a transfecção, as células foram colhidas e o RNA total foi extraído utilizando o kit de isolamento de RNA MirVana. O cDNA foi produzido com 1 µg de RNA/reAÇÃO utilizando oligo-dT e Superscript III (Invitrogen). O mRNA da huntingtina foi medido através de um ensaio TaqMan (ThermoFisher). Os níveis relativos do mRNA da huntingtina foram calculados usando o método de ΔΔC(T) com a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) como o gene constitutivo.

Abrigo, injeções e manutenção do camundongo

[000150] Camundongos YAC128 e FVB do tipo selvagem foram obtidos. Os camundongos foram criados no fundo FVB por acasalamento de camundongos machos do tipo selvagem com fêmeas YAC128. Os camundongos heterozigotos resultantes YAC128 e do tipo selvagem foram mantidos em um cronograma de luz 12:12 e tiveram acesso a alimentos e água ad libitum. Os genótipos foram verificados por PCR do DNA extraído de cortes da cauda ou punções da orelha. Os camundongos foram injetados com AAV selecionado diretamente no estriado por meio de um stereotax para animal pequeno SAS-4100 (ASI Instruments, Warren, MI) auxiliado por microinjetores UMPc3 ou UMPc4 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Os camundongos foram anestesiados com 284mg/kg de tribromoetanol e colocados no stereotax. A cirurgia foi realizada com o auxílio do bregma como o ponto zero, medindo 1,0 mm anterior, 2,0 mm lateral e abaixando uma agulha de 33 guage, 3,0 mm no estriado. As bombas foram definidas para entregar 3,0 ul a uma taxa de 125 nl/minuto. Após as injeções os camundongos foram deixados em descanso para recuperação sobre uma almofada de aquecimento e, em seguida, colocados de volta em suas gaiolas na área do abrigo.

Extração de tecido

[000151] No momento apropriado, os camundongos foram sacrificados e o tecido extraído para análise de RNA ou imunoistoquímica. Para extração de RNA, os camundongos foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical. Cérebros foram removidos e o estriado foi dissecado. Quando disponível, a expressão de GFP foi usada para guiar a dissecção de modo que somente tecido positivo por GFP foi analisado. O tecido foi colocado imediatamente no RNALater (Ambion). Posteriormente, eles foram armazenados congelados a -80° C. No final do experimento, os camundongos destinados a imunocitoquímica foram profundamente anestesiados e perfundidos intracardialmente com solução salina seguido por paraformaldeído a 4%. As amostras foram pós fixadas durante a noite em paraformaldeído frio a 2% e, em seguida, armazenadas em solução salina tamponada com fosfato a 4° C. Os cortes coronais foram feitos por cortar seções de 40 micrônus sobre o vibratome Leica VT1000s.

Comportamentos do camundongo

[000152] Andar na trave: Os camundongos foram treinados para atravessar uma trave (tamanho da trave). Após o treinamento, os camundongos foram registrados enquanto eles atravessaram de uma extremidade da trave para a outra. Três ensaios por camundongo foram registrados. Com base no registro, a quantidade de tempo que levou para os camundongos cruzarem da marca em uma extremidade da trave para a outra foi medido.

[000153] Atividade na gaiola: Os camundongos foram colocados individualmente em um sistema de digitalização de fenotipagem de gaiola automatizado (Clever Sys, Inc., Reston VA) paor 26 horas. Para calcular o tempo ativo médio por hora, a primeira hora de dados durante a qual o camundongo se adaptou ao novo ambiente foi

removida; em seguida, o tempo total gasto andando pelo tempo total registrado, menos de uma hora, foi calculado.

Imunoistoquímica e quantificação

[000154] Fatias de tecido fixadas foram bloqueadas com peróxido de hidrogênio a 3% por três minutos e, em seguida, incubadas com triton a 0,5% x por 20 minutos. A imunocitoquímica foi realizada usando os reagentes do kit Vector Laboratories Elite ABC para anticorpos derivados de coelho ou rato contra DARPP32 (Abcam ab40801; diluição 1:10.000), Iba1 (Wako 019-19741; diluição 1:1000), GFP (Life Technologies G10362; diluição 1:1000) e NeuN (EMD Millipore MAB377; diluição 1:1000). Os cortes foram corados por 2 minutos com diaminobenzidina utilizando o Kit de substrato DAB reforçado com metal (Pierce).

Clonagem e análise de biblioteca de pequeno RNA

[000155] O RNA total foi extraído utilizando o kit de isolamento de RNA MirVana. A seleção do tamanho de RNAs de 18-30 nucleotídeos foi realizada usando 5 µg de RNA total em um gel de poliacrilamida desnaturante a 15%. Após a seleção do tamanho, os pequenos RNAs foram precipitados com etanol e ligados a um 3'-adaptador pré-adenilado (5'-rAppTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/ddC/-3'; SEQ ID NO: 11). Os produtos ligados foram temperados para o primer RT (5'-CCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'; SEQ ID NO: 12) e ligados a um adaptador de 5' (RNA: 5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC-3'; SEQ ID NO: 13). A transcrição reversa foi realizada através de mistura da transcriptase reversa AMV (NEB) e PCR amplificada com AccuPrime Pfx DNA polimerase (Invitrogen) com um primer universal (5'-
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTCAGAGTTCTACAG
TCCGA-3'; SEQ ID NO: 14) e um primer com código de barras (5'-
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNGTGACTGGAGTTCC

TTGGCACCCGAGAATTCCA-3'; SEQ ID NO: 15). Bibliotecas foram sequenciadas e mapeadas para o genoma mm9 e genoma AAV. Espécies de miRNA foram classificadas com base na posição do mapeamento de extremidade 5' no miRNA em forma de grampo (hairpin), portanto cada espécie consiste de todos os pequenos RNAs com sequências de sementes compartilhadas. A extremidade 3' não foi considerada na atribuição de espécies. Expressão diferencial de miRNAs endógenos foi analisada através do pacote edgeR.

Clonagem e análise da biblioteca de mRNA

[000156] O RNA foi extraído conforme acima. As bibliotecas foram construídas por métodos padrão. As leituras foram mapeadas utilizando topHat2 e a expressão diferencial foi calculada utilizando o pacote deseq2.

Experimentos de ovinos

[000157] Um modelo de ovinos transgênicos da doença de Huntington (por exemplo, ovinos transgênicos expressando a proteína huntingtina humana patogênica) foi injetado com scAAV9-CBA-mir-HTT (compreendendo miRNA 6433 em uma estrutura principal mir-155), scAAV-U6-mir-HTT (compreendendo miRNA 6433 em uma estrutura principal mir-155), ou vetor de controle vazio scAAV9. Os ovinos eram sacrificados em um mês ou seis meses pós-injeção. Amostras de tecido e de ácido nucleico foram preparadas e analisadas por PCR quantitativa e imuno-histoquímica.

Exemplo 2: Experimentos in vivo de camundongo

Design e seleção de miRNAs artificiais visando a huntingtina

[000158] Nove sequências visando o mRNA da huntingtina humana (Tabela 1, FIGs. 1) foram testadas. Um esquema mostrando a localização das nove sequências alvo é fornecido na FIG. 4A. Duas cópias do miRNA artificial foram clonadas em conjunto em uma estrutura principal baseada no miRNA-155 endógeno ou miR-30 e todo

o miRNA artificial foi inserido no 3'-UTR de EGFP (FIG. 5A, topo). As estruturas em forma de grampo (hairpin) previstas dos amiRNAs anti-HTT com base em mir-155 e mir-30 são mostrados nas FIGs. 25A-25B, respectivamente. Os plasmídeos resultantes foram transfetados em células Hela. Quarenta e oito horas mais tarde, as células foram colhidas e os níveis de mRNA da huntingtina endógeno foram medidos por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). Três dos nove miRNAs artificiais reduziram a huntingtina em mais de 50% (FIGs. 1-2 e 4B-4C).

Tabela 1: Alvos da huntingtina mir

Nome	Sequências de miRNA maduro	SEQ ID NO:
miR-1873-anti-HTT	5'-TAAATGTGCCCTGTTGAAGGGC-3'	2
miR-2029-anti-HTT	5'-AAGAGGTGCAGAGTCATCATC-3'	3
miR-4173-anti-HTT	5'-TTCTGGAGGACATCAAACCAT-3'	4
miR-4448-anti-HTT	5'-TGAACTGGCCCACTTCAATGT-3'	5
miR-6088-anti-HTT	5'-TTCCATTGGCAACTGGGCCAT-3'	6
miR-6433-anti-HTT	5'-TAAGCATGGAGCTAGCAGGCT-3'	7
miR-TS1-anti-HTT	5'-TAGCGTTGAAGTACTGTCCCC-3'	8
miR-TS2-anti-HTT	5'-TTGAGGCAGCAGCGGCTGTGC-3'	9
miR-E14-anti-HTT	5'-TTCATCAGCTTCCAGGGTC-3'	10

[000159] Três sequências da triagem inicial foram selecionadas para experimentos *in vivo*. Um miRNA artificial baseado em um conhecido siRNA (E1.4) também foi testado. Sequências candidatas foram empacotadas em um vetor AAV9 autocomplementar e injetadas diretamente no estriado de camundongos transgênicos expressando a huntingtina humana com uma extensão de aproximadamente 128 poliglutaminas codificando as repetições (camundongos Yac128). Um mês mais tarde, a distribuição de AAV9 e expressão do GFP repórter foram avaliadas em três doses diferentes. Na maior dose, a coloração GFP esteve presente durante todo o estriado (FIG. 11A) e o mRNA da

huntingtina humana foi significativamente reduzido em camundongos tratados com AAV9-C β A-anti-HTT-6433 ($p=0,006$) ou AAV9-C β A-anti-HTT-5155 ($p=0,013$, Fig. 4C; a estrutura principal de mir-155 foi utilizada). Reduzindo a dose do vetor resultou na redução da expressão de GFP (FIG. 11A) e a uma diluição de 1:10, nenhuma redução significativa do mRNA da huntingtina humana foi alcançada (FIG. 11B). A Figura 11C fornece fotografias representativas de camundongos injetados com um vetor codificando tanto o miRNA visando a huntingtina como o EGFP em três doses diferentes.

[000160] A expressão do miRNA artificial do promotor U6 não melhora o silenciamento da huntingtina.

[000161] Uma única cópia do miRNA mais potente (HTT-6433) foi clonada em um vetor AAV9 sob o controle do promotor U6 (FIG. 5A, parte inferior). Os camundongos foram injetados unilateralmente com as duas cópias originais AAV9-CBA-anti-HTT-6433 (compreendendo a SEQ ID NO: XX), AAV9-CBA-anti-HTT-5155, AAV9-U6-anti-HTT-6433 (compreendendo a SEQ ID NO: XX ou AAV9-U6-anti-HTT-5155. Um mês depois, o estriado foi colhido e a expressão de GFP foi confirmada e o nível do mRNA da huntingtina foi medido por qRT-PCR. Independentemente da sequência do miRNA artificial, nenhuma diferença significativa na inativação entre os camundongos tratados com AAV9-U6-anti-HTT e AAV9-CBA-anti-HTT foi observada. Em ambos os camundongos tratados com AAV9-U6-anti-HTT-6433 e AAV9-CBA-anti-HTT-6433, a quantidade de mRNA da huntingtina no lado injetado foi de, aproximadamente, 50% do que no lado não injetado (FIG. 5B). Observe que com o lado contralateral (não-injetado) como um controle para cada animal reduz a variabilidade de animal para animal. Em camundongos injetados com AAV9-GFP unilateralmente, um pequeno número de neurônios positivos de GFP no lado contralateral são ocasionalmente observados, indicando que

alguns vírus se espalham para o lado não-injetado. Por isso, usando o lado contralateral como controle pode subestimar a inativação. Para eliminar os potenciais efeitos de confusão usando o lado contralateral como controle, o experimento foi repetido com um grupo de animais injetados com PBS apenas como controle. Os dados indicam que tanto o AAV9-U6-anti-HTT-6433 como o AAV9-CBA-mir-HTT-6433 reduziram o mRNA da huntingtina em aproximadamente 50% (FIG. 5C).

[000162] Expressão estriatal de longo prazo do mir-HTT-6433 a partir de um promotor U6 é tóxica em camundongos.

[000163] AAV9-U6-anti-HTT-6433 ou AAV9-CBA-anti-HTT-6433 foram injetados unilateralmente diretamente no estriado de camundongos Yac128. Seis meses após a injeção, observou-se que os camundongos injetados com AAV9-U6-anti-HTT-6433 não estavam aninhando e alguns apresentaram um fenótipo hiperativo. Para documentar essas anormalidades, os ninhos em cada gaiola foram substituídos. Vinte e quatro horas mais tarde, os novos ninhos do AAV9-U6-anti-HTT-6433 não foram usados enquanto que camundongos injetados com PBS e AAV9-CBA-anti-HTT-6433 fizeram ninhos como esperado (FIG. 6A). Utilizando um sistema de monitoramento de gaiola, os camundongos foram registrados por vinte e quatro horas. Camundongos tratados com AAV9-U6-anti-HTT-6433 gastaram significativamente mais tempo movendo-se em torno de sua gaiola do que camundongos tratados com PBS ou com AAV9-CBA-anti-HTT-6433 (FIG. 6B). A média de tempo que levou para os camundongos atravessarem a trave também foi medida. Para este teste, os camundongos são exigidos completar o cruzamento da trave três vezes. Em média, os camundongos tratados com AAV9-CBA-anti-HTT-6433 tenderam a atravessar mais rápido do que camundongos que receberam apenas uma injeção de PBS (FIGs. 3 e 12A). Dos

quatro camundongos restantes no grupo AAV9-U6-anti-HTT-6433, dois foram incapazes de atravessar com êxito, quer saltando ou caindo da trave (FIG. 12A). Em um segundo experimento realizado em camundongos mais velhos Yac128 (7 meses de idade), uma idade foi relacionada com aumento no tempo para atravessar a barra foi observada. Este aumento esteve presente em ambos os camundongos virgens de tratamento e camundongos tratados com AAV9-CBA-anti-HTT-6433 e foi acelerado em camundongos tratados com AAV9-U6-anti-HTT-6433 (FIG. 12B).

[000164] Achados neuropatológicos foram correlacionados com os resultados comportamentais descritos acima. No lado injetado, os camundongos AAV9-U6-anti-HTT-6433 mostraram alargamento do ventrículo, perda de neurônios positivos DARPP-32 e encolhimento estriatal (FIGs. 7A-7B). No estriado restante, eles apresentaram aumento de coloração Iba1 (FIG. 8A, parte inferior), um aumento no total e a microglia ativada e uma diminuição do número de microglia restante (FIGs. 8B-8D). Camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem e camundongos FVB foram injetados com os mesmos vetores e as consequências do miR dirigido por U6 foram avaliadas para determinar se a toxicidade foi dependente da presença da huntingtona mutante nesse contexto. Em camundongos FVB, o efeito foi semelhante ao de camundongos Yac128 com degeneração rápida na trave e ventrículos severamente alargados. No entanto, em camundongos C57BL6, o efeito esteve presente, mas menos pronunciado. Enquanto houve um aumento inicial no tempo para atravessar a trave na coorte do U6, ao final do estudo não houve diferença significativa entre os grupos (FIG. 13A). Encolhimento estriatal também foi menos severo em camundongos C57BL6 (FIG. 13B).

Expressão do miRNA artificial visando a huntingtina a partir de um promotor U6 resulta em superexpressão do pequeno RNA visando a

huntingtina

[000165] Grupos de camundongos foram injetados unilateralmente com vetores scAAV9 expressando o miRNA 6433 artificial dos promotores U6 e C β A. Os pequenos RNAs produzidos em duas semanas pós-injeção foram clonados e sequenciados. Em ambos os grupos, noventa e seis por cento das sequências mapeadas para o genoma de AAV foram mapeadas para o produto de pequeno RNA esperado, com apenas uma pequena percentagem representando clivagem Dicer ou Drosha imprecisa. No grupo injetado com o miRNA artificial dirigido pelo promotor U6, a sequência de alvejamento da huntingtina dominou os resultados da sequência, representando metade (50%) de todas as sequências mapeáveis, enquanto que nos camundongos injetados com o vetor CBA, apenas 5% das sequências corresponderam ao pequeno RNA codificado pelo vetor (FIG. 9A). Assim, potencialmente, pequenos RNAs com sequências de sementes alternativas, incluindo a fita senso e produtos de deslizamento, podem estar presentes em níveis comparáveis aos dos miRNAs endógenos funcionais (FIG. 9A). A quantidade relativa do pequeno RNA visando a huntingtina foi medida por qPCR para confirmar a superexpressão da sequência visando a huntingtina. Foi observado que a expressão do pequeno RNA foi 150 a 250 vezes maior nos camundongos injetados com a construção dirigida pelo promotor U6 (FIG. 9B).

[000166] Sequências de miRNA 30 endógeno são comumente usadas como uma armação para o miRNA artificial. Para determinar se os perfis de isomiR derivados desta armação foram mais favoráveis, a sequência anti-HTT-6433 foi enbebida em uma estrutura principal de miR-30 e injetada em camundongos Yac128 de 10 semana de idade (FIG. 9C). A estrutura do mir-30 produz níveis do miRNA maduro artificial que são comparáveis aos produzidos pelo promotor C β A (FIG.9A) e reduz a huntingtina humana por perto de 50%. Ao

contrário da estrutura do mir-155, a estrutura do mir-30 produz a fita senso madura (passageira) em níveis comparáveis às fitas antisenso (guia). A combinação do promotor C β A com a estrutura principal do mir-155 produz somente fitas antisenso acima do fundo (FIG. 9A).

[000167] Embora mais da metade das leituras na amostra possa ser mapeada para o miRNA artificial codificado por AAV, a superexpressão da huntingtina visando o miRNA artificial teve efeitos mínimos sobre a distribuição dos miRNAs endógenos (FIGs. 14A-14B). Na verdade, as maiores diferenças foram observadas quando os grupos injetados foram comparados em relação ao lado não-injetado (contralateral), sugerindo que a injeção em si produz uma alteração no local em perfis de miRNA. Isso pode refletir uma resposta inflamatória local à lesão que poderia resolver ao longo do tempo.

Expressão do miRNA artificial visando a huntingtina a partir de um promotor U6 perturba a expressão de mRNAs múltiplos

[000168] A análise RNAseq do estriado de camundongos tratados com AAV9-U6-anti-HTT-6433 ou AAV9-CBA-anti-HTT-6433 foi realizada para investigar as consequências da superexpressão do miRNA visando a huntingtina. Duas semanas pós-injeção, os perfis de mRNA estriatal nos lados injetados e não injetados foram comparados. Os dados indicam que houve poucas diferenças significativas em camundongos tratados com o CBA-mirHTT-6433 (FIG. 14A). Em camundongos tratados com AAV9-U6-anti-HTT-6433, os mRNAs que foram aumentados e aqueles que foram diminuídos em resposta ao tratamento foram observados (FIG. 14B). Quando os perfis de AAV9-U6-anti-HTT-6433 e AAV9-CBA-anti-HTT-6433 foram comparados em duas semanas, observou-se que apenas 8 mRNAs foram significativamente expressos diferencialmente entre estes dois grupos. Os RNAs foram classificados de acordo com a presença ou ausência de sítios alvo previstos para o miRNA artificial e plotadas as alterações

na distribuição acumulada em mRNAs onde os locais alvo estavam presentes ou ausentes. Nos camundongos injetados com o AAV-U6-6433, uma pequena mudança para regulação negativa de genes contendo em seus 3'-UTRs, locais perfeitos alvos 8mer correspondente às espécies mais abundantes de pequeno RNA derivado de AAV foram observados (FIG. 10B). Essa mudança não foi aparente em camundongos injetados com AAV-CBA-6433 (FIG. 10A) nem com qualquer das outras espécies de pequeno RNA derivado de AAV (FIGs. 15A-15C).

Exemplo 3: Experimentos in vivo de ovinos

[000169] Um modelo de ovinos da doença de Huntington humana foi usado neste exemplo. Brevemente, ovinos transgênicos que expressam a proteína huntingtina humana (HTT humana) foram produzidos. Ovinos foram injetados intrastriatalmente com scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor controle vazio scAAV9. Cada construção compreende uma única cópia da sequência do mir-6433 anti-huntingtina (SEQ ID NO: 7) inserida em uma estrutura principal do mir-155 localizada dentro de um íntron que está entre o promotor CBA ou promotor do U6, respectivamente, e uma sequência de poliadenilação da β-globulina. As construções usadas para produzir rAAVs administradas neste experimento estão estabelecidas nas SEQ ID NOs: 18 (scAAV9 CBA-mir-HTT) e 19 (scAAV9 U6-mir-HTT).

[000170] Os ovinos foram sacrificados em um mês ou seis meses pós-injeção. Amostras de tecido e de ácido nucleico foram preparadas e analisadas por PCR quantitativa e imunoistoquímica.

[000171] Os dados indicam que, no ponto de tempo de um mês, a injeção de mir-HTT expressada sob o promotor U6 resultou em uma redução na expressão de HTT tanto no caudado médico como no putâmen médio de ovinos quando comparada aos camundongos não-

injetados e de controle injetados com scAAV9 vazio. A Figura 16 mostra os dados relativos à redução da expressão da HTT humana no caudado médio de ovinos um mês pós-injeção de scAAV9 U6-mir-HTT. A Figura 17 mostra os dados relativos à redução da expressão da huntingtina humana no putâmen médio de um modelo de ovino um mês pós-injeção de scAAV9 U6-mir-HTT. Observe que, ao contrário do modelo de camundongo descrito no exemplo anterior, o mir-HTT expressado do promotor de U6 não era tóxico no modelo de ovinos da doença de Huntington.

[000172] Os dados indicam que, no ponto de tempo de seis meses, a injeção de mir-HTT expressada sob o promotor CBA resultou em uma redução na expressão de HTT tanto no caudado médico como no putâmen médio de ovinos quando comparada aos camundongos não-injetados e de controle injetados com scAAV9 vazio.

[000173] As Figs. 18 e 19 mostram os dados relativos à redução da expressão da HTT humana nos lados médios (FIG. 18) e laterais (FIG. 19) do caudado médio de ovinos. Os dados indicam o mir-HTT expressado a partir de um promotor CBA provoca uma redução da expressão da HTT humana no lado injetado do cérebro quando comparado ao lado não-injetado do cérebro e camundongos controle injetados com scAAV9 vazio. Os efeitos da expressão do mir-HTT dos promotores CBA e U6 no silenciamento de HTT no caudado médio também foi comparado seis meses pós-injeção. Dados indicam que o mir-HTT expressado do promotor U6 ou promotor CBA resulta em uma redução da expressão da HTT humana no caudado médio quando comparado aos animais controle não-injetados e injetado com scAAV9 vazio (FIG. 20).

[000174] As Figs. 21 e 22 mostram os dados relativos à redução da expressão da HTT humana nos lados laterais (FIG. 21) e medianos (FIG. 22) do meio putâmen médio de ovinos seis meses pós-injeção.

Os dados indicam o mir-HTT expressado a partir de um promotor CBA provoca uma redução da expressão da HTT humana no lado injetado do cérebro quando comparado ao lado não-injetado do cérebro e camundongos controle injetados com scAAV9 vazio. Os efeitos da expressão do mir-HTT dos promotores CBA e U6 no silenciamento de HTT no caudado médio também foi comparado seis meses pós-injeção. Dados indicam que o mir-HTT expressado do promotor U6 ou promotor CBA resulta em uma redução da expressão da HTT humana no putâmen médio quando comparado aos animais controle não-injetados e injetado com scAAV9 vazio (FIG. 23).

[000175] A Figura 24 mostra os dados relativos à expressão relativa do RNA da huntingtina humana (htt humana) no estriado anterior de um modelo de ovelha da doença de Huntington, seis meses após injeção intrastriatal de scAAV9 CBA-mir-HTT ("promotor CBA"), scAAV9 U6-mir-HTT ("promotor U6"), ou vetor de controle scAAV9 vazio.

Exemplo 4: miRNAs artificiais reduzem a huntingtina humana mutante em todo o estriado em um modelo de ovinos transgênicos da doença de Huntington

Animais e procedimentos animais

[000176] Ovinos merino foram utilizados neste exemplo. Antes da administração do anestésico, os animais foram deixados em jejum durante a noite por cerca de 8 horas. Os animais receberam um pré-operatório físico, incluindo a frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura e peso. As amostras da linha de base do soro (5 ml) e CSF foram coletadas.

[000177] O estudo foi conduzido em duas partes, com duas diferentes coortes de ovinos. Para o primeiro estudo, quarenta e um animais transgênicos (21 carneiros, 20 ovelhas), com idade aproximada de 8 meses, foram injetados, unilateralmente, com 300 µl

de vetor auto-complementar scAAV9 (AAV9) em um título de 1×10^{13} gc/ml para um total de 3×10^{12} cópias do genoma. Para o segundo estudo, 14 animais com 14 meses foram injetados com esse vetor e 14 com o vetor de controle. O gadolínio foi adicionado à formulação do vetor para permitir imagens pós-cirúrgica da propagação da injeção. Os animais foram movidos para a sala de operação e preparado para a cirurgia. Eles descansaram na posição de esfinge sobre uma almofada de espuma em extremidades dobradas ou com extremidades penduradas. Uma estrutura estereotáxica (Kopf, animal de grande porte) foi usada para manter a cabeça do animal no lugar. Líquido cefalorraquidiano foi coletado através de punção lombar, usando uma cânula de 19 gauge. O rAAV foi entregue diretamente ao estriado, visando a cápsula interna. A cabeça do animal foi raspada, preparada com betadine, e coberto com plástico transparente. Uma incisão curvilínea foi feita usando um bisturi #15 para expor o bregma. Uma vez que o bregma foi identificado, um orifício de saliência de 3 - 4 mm foi colocado 10 mm rostral ao bregma e 11 mm da lateral da linha mediana usando uma broca elétrica. A cânula de entrega aprimorada de convecção (CED) foi fixada no manipulador e preparada com agente a ser injetado para remover o ar da linha. A dura-máter foi aberta com uma incisão de 1,5 mm usando um bisturi #11 e a cânula CED foi avançada 25 mm da superfície da dura-máter para a profundidade alvo. A cânula externa (1,65 mm) selou a incisão dural para evitar vazamento CSF durante a infusão. A infusão começou 5 minutos após a inserção da cânula para permitir que o tecido em torno da ponta se estabilizasse. A taxa de infusão foi de 3,33 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ até um volume total de 300 μl ser injetado. Dez minutos após a infusão ser completada a cânula foi lentamente retirada e um plug de cera óssea foi utilizado para reparação do crânio e evitar vazamento de CSF. O ferimento foi limpo com soro fisiológico e fechado com uma sutura

vicryl 3,0. Anestesia padrão de despertar e recuperação de procedimento foi seguido. IRM pós-cirurgia foi realizada para determinar a propagação de gadolínio. Um animal do primeiro estudo foi excluído após a cirurgia porque nenhum gadolínio foi visível na imagem e um segundo animal do segundo estudo foi excluído porque o gadolínio parecia ser principalmente no ventrículo. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em observação por três dias e alojados internamente por 5 dias. Eles foram então transferidos para o exterior e abrigados ao ar livre em cercados para o restante do estudo. Os animais foram monitorados visualmente para sinais de sofrimento e a mudança de comportamento ao longo do estudo. Dois animais sofreram complicações cirúrgicas, resultando em paralisia parcial do membro. Isto deve ter sido devido ao posicionamento dos animais sob anestesia. Um foi anestesiado cedo e foi movido de um coorte de seis meses para o de um mês. Os animais foram pesados periodicamente durante o período pós-injeção e amostras de líquido cefalorraquidiano, sangue e soro foram tiradas e guardadas para posterior análise.

[000178] Para contagem de células e diferenciais, o sangue foi coletado através de punção venosa jugular em um tubo de coleta de sangue EDTA de potássio (topo lavanda; LT) e um exame de sangue completo com diferencial (diferencial CBE) foi realizado. Para química clínica, o sangue foi coletado através de punção venosa jugular em um tubo de coleta de soro (topo vermelho; RT). As amostras foram submetidas a várias análises bioquímicas (MBA).

[000179] Em um e seis meses pós-injeção os animais foram colhidos, com animais sendo utilizados tanto para histologia ou análise bioquímica. Os animais foram transportados para a mesa de operação e colocados em decúbito ventral, enquanto cerca de 6 mL de CSF foram coletados. O animal foi reposicionado em decúbito dorsal. As artérias carótidas foram expostas e canuladas a uma profundidade de

4 cm da ponta da cânula. As veias jugulares foram expostas e 200-500 U heparina /kg foram injetadas na veia jugular. Cinco minutos após a administração da heparina, os ovinos foram sacrificados por injeção intravenosa de Lethabarb (325mg de pentobarbitona de sódio/ml) em 1 ml/2 kg de peso corporal. Bomba de infusão foi preparada com NaCl frio a 9% e conectada às cânulas da carótida. O animal foi perfundido com aproximadamente 8L de NaCl frio a 9%, a uma pressão de 500 mmHg. Para histologia, a infusão foi mudada para 8L de paraformaldeído a 4%, a uma pressão de 500mmHg. O cérebro e o fígado foram extraídos. Os tecidos foram pós-fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas a 4°C e transferidos para sacarose a 30% em 1X solução salina tamponada com fosfato, durante um período mínimo de 14 dias a 4 °C.

[000180] Para ensaios de RNA, proteína e DNA, os ovinos foram perfundidos com NaCl frio a 9% como descrito acima. Coleção de tecido periférico foi realizada na seguinte ordem: fígado, glândula adrenal, ovários (se aplicável), músculos e coração. Contaminação cruzada foi impedida pelo uso de diferentes instrumentos e superfícies de necropsia de lavagem com água sanitária a 10% e etanol a 70%. O órgão foi retirado do corpo e uma punção de biópsia de 3mm foi utilizada para coletar as amostras. Um total de dez amostras foram coletadas de cada órgão; duas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e oito amostras foram armazenadas em RNAlater a 4°C durante 24 horas (300 µl de RNA mais tarde para as amostras do fígado, músculos e coração, 500µl de RNAlater para amostras da glândula supra-renal e ovário).

[000181] O cérebro foi retirado do crânio com uma serra circular e pinça óssea. Após a extração, o cérebro foi pesado e colocado ventralmente em uma matriz de cérebro plexiglass customizada. Nove cortes foram feitos ao cérebro para conter o estriado em 4 blocos de 6

mm. O primeiro corte foi feito posterior à fixação do bulbo olfatório (aproximadamente 18 mm a partir do início da matriz) e os quatro cortes subsequentes foram feitos em intervalos de 6 mm. O estriado foi dividido em quatro blocos de 6 mm do posterior para o anterior: 2p (posterior), 2m1 (1) medial, 2m2 (medial 2) e 2a (anterior). A dissecção do estriado foi realizada na seguinte ordem: 2p, 2m1, 2a. O estriado no hemisfério direito (não-injetado) foi dissecado primeiro em todos os blocos e lâmina de bisturi foi alterada entre os hemisférios. A dissecção foi realizada em uma placa de petri em gelo seco e foi tomado o cuidado de retirar o máximo de matéria branca do tecido estriatal quanto possível. Uma vez dissecado, os pedaços estriatais (caudado e putâmen) foram divididos ao meio; com o pedaço medial (mais próximo à linha média do bloco) foi armazenado em 1ml de RNAlater em 4 °C e o pedaço lateral foi congelado em nitrogênio líquido. A dissecção estriatal para a coorte de 6 mês no estudo CBA foi feita de forma a produzir quatro amostras estriatais tanto do caudado como do putâmen. As seções dorsais (medial e lateral) foram congeladas em nitrogênio líquido e as seções ventrais (medial e lateral) foram armazenadas em 1ml de RNAlater a 4 °C. O RNAlater foi removido após vinte e quatro horas, e as amostras foram armazenadas a -80 °C.

[000182] O bloco 2m2 foi generosamente coberto com OCT e congelado em um 2-metilbutano e banho de gelo seco. O restante do bloco 2a, 2m1 e 2p foi congelado da mesma maneira. Dez amostras de córtex foram retiradas de cada bloco em uma forma dorsal para ventral; dois foram congelados em nitrogênio líquido e oito foram armazenados em 1ml de RNAlater a 4 °C.

Seccionamento de tecidos para análise histológica

[000183] Antes do seccionamento do tecido para análise histológica o estriado foi isolado do cérebro, generosamente coberto com OCT, e

armazenado a -20°C durante vinte e quatro horas. Cortes coronais, medindo 40 µm de espessura foram cortados com um micrótomo deslizante (Reichert-Jung Tetrander sliding microtome) através de todo o estriado. As seções foram armazenadas em azida de sódio a 0,01% em solução salina tamponada com fosfato 1X a 4 °C.

Clonagem do vetor e produção de rAAV9

[000184] Para o primeiro estudo, o vetor de teste continha um vetor promotor U6 dirigindo um miRNA artificial baseado na estrutura principal do mir155 endógeno (AAV9-U6-miRHTT). O miRNA artificial alveja a huntingtina humana, mas não a huntingtina ovina. Um potencializador do citomegalovírus quimérico/promotor da β-actina de galinha (CBA) dirigindo um íntron quimérico foi incluído para melhorar o empacotamento de AAV. O vetor controle (AAV9) continha apenas o promotor CBA vazio e o íntron. No segundo estudo, o vetor de teste continha o potencializador CMV e promotor CBA, e o íntron e o miRNA artificial com base no miRNA-155 (AAV9-CBA-miRHTT).

[000185] Para o empacotamento, o plasmídeo do vetor de rAAV, um plasmídeo de empacotamento e um plasmídeo ajudante do adenovírus são co-transfetados em células HEK 293. O plasmídeo empacotado expressa as proteínas regulatórias e do capsídeo de AAV9 levando à excisão, replicação e empacotamento do genoma recombinante do plasmídeo do vetor de rAAV em vírions de AAV. Os vírus recombinantes são purificados por sedimentação gradiente de CsCl padrão e dessalgado por diálise.

Análise dos níveis de mRNA da Huntingtina

[000186] Os níveis de RNA nas amostras de RNAlater preservadas foram analisados utilizando um ensaio de DNA ramificado (bDNA). As amostras foram processadas de acordo com as orientações do fabricante para a preparação de homogenatos de tecido a partir de tecidos armazenados no RNAlater (Affymetrix eBioscience,

Quantigene® Kit de processamento de amostras). As amostras homogeneizadas foram analisadas de acordo com as orientações do fabricante para o ensaio bDNA (QuantiGene® 2.0 Reagent System). As amostras foram analisadas com uma sonda para detectar a huntingtina humana (Human HD, SA-50339 de Quantigene), huntingtina ovina (Huntingtina de ovelha, SF-10586 de Quantigene) e calnexina ovina como um gene de limpeza (Calnexina de ovelha, SF-10622, de Quantigene). Os resultados do teste foram medidos com um luminômetro Tecan Infinite M1000 PRO (tempo de integração configurado a 200ms).

Análise dos níveis de miR-Htt

[000187] Punções de biópsia (2mm) foram amostradas do caudado lateral e putâmen mediano de blocos congelados. As extrações de RNA foram realizadas utilizando as orientações do fabricante TRIzol (Ambion) com algumas modificações feitas. Após a separação das fases na extração de TRIzol, a fase aquosa foi transferida para a coluna de RNA Clean & Concentrador (Zymo) e o protocolo foi seguido. O RNA foi armazenado a -80°C até o momento das análises. A qualidade e a concentração do RNA foram determinadas com um analisador de fragmento (Advanced Analytical Technologies Inc.). Imediatamente antes da análise, o RNA foi diluído para 20 ng/µl. As fitas guia de miRNA artificial foram retro-transcritas utilizando o kit de transcrição reversa MicroRNA TaqMan (Cat# 4366596, Thermo Scientific), 2µl de RNA e primers específicos haste-alça da fita guia (ensaio personalizado da ThermoFisher visando UAAGCAUGGAGCUAGCAGGCU (SEQ ID NO: 25) ou ensaio id 002407, let7e*), de acordo com as instruções do fabricante. As reações ddPCR foram configuradas usando 5µl de produtos RT, uma concentração de 1x do ensaio miR-Htt e uma concentração de 0,3x do ensaio let-7e* para permitir a multiplexagem. Foram geradas gotas

com um gerador de gotas QX200 (Cat# 1864002, Biorad) e monitoradas para sinal positivo após desfecho da amplificação por PCR (40 ciclos). Expressão relativa de miRHTT foi determinada pelo cálculo da razão entre as concentrações absolutas de miRHTT e let-7e*.

Distribuição do genoma do vetor

[000188] O DNA genômico foi extraído de amostras que tinham sido congeladas em nitrogênio líquido, usando o kit de tecido Gentra Puregene (Qiagen). As concentrações do DNA genômico foram medidas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ONEc. PCR digital em gotas (ddPCR, Biorad) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante, usando 50 ng de DNA como entrada e ensaios TaqMan detectando o CB específico do vetor e o promotor U6 do gene de referência HPRT. Os resultados são expressados como o genoma do vetor por genoma diplóide (vg/dg).

Análise dos níveis de proteína Huntingtina-- Ensaio de detecção de Mesoescala (MSD) para mHTT

[000189] As amostras do estriado foram homogeneizadas em tampão composto de 10 mM HEPES, 250 mM sacarose, 1 mM EDTA e inibidores de protease (Roche) e sonicadas 10s a 10% de amplitude. A concentração de proteínas foi medida utilizando o ensaio de Bradford. Uma placa padrão de 96 poços QuicPlex (MSD) foi revestida com anticorpo da região 1220 da prolina anti-HTT monoclonal de coelho (D7F7, sinalização celular, 1:250) em PBS, durante a noite, a 4°C. A placa foi lavada 3x 10 min com PBST (PBS + Tween20 a 0,05%) e bloqueada com albumina sérica bovina (BSA) a 3% em PBS por 2 horas, a temperatura ambiente (TA). Depois de lavar 3x 10 min com PBST, duplicatas técnicas de amostras com 20 µg de proteína em 25 µL de tampão de homogeneização ou brancos (tampão de homogeneização) foram distribuídas na placa e incubadas durante a

noite a 4°C em um agitador orbital. A placa foi lavada 3x 10 min em PBST e incubada na mistura de anticorpos secundários/de detecção como segue: Para a detecção de mHTT, anticorpo monoclonal de camundongo anti-polyQ MW1 (DSHB) foi misturado com anticorpo de detecção anti-camundongo SulfoTag (MSD), a 1 µg/mL de cada anticorpo em BSA a 1% em PBS. 30 µL da mistura do anticorpo de detecção foi aplicada por poço e incubada por 3 horas a TA em agitador orbital. A placa foi lavada 3x 10 min em PBST e 150 µL de tampão de 2x (MSD) foi aplicado por poço antes da leitura de QuickPlex SQ120 (MSD).

Western blotting

[000190] Pedaços pequenos de tecido foram removidos de blocos congelados e homogeneizado em gelo em 200 µl 10 mM HEPES, pH7,2, 250 mM sacarose, 1mM EDTA + comprimido inibidor da protease (mini, completo, sem EDTA Roche #11836170001). Amostras estavam sonicadas por 10 segundos e a concentração de proteína foi determinada usando o método de Bradford (BioRad #500-0006). Concentrações iguais de proteína (25 µg) foram separadas por SDS-PAGE em géis de tris-acetato a 3-8% (Life Technologies #EA03785BOX) e transferidas para nitrocelulose utilizando TransBlot Turbo (BioRad). Blots foram bloqueados em leite em pó desnatado a 5% em solução salina tamponada Tris + Tween-20 a 0,1% (TBST) por 1 hora e incubados durante a noite em anticorpo primário a 4°C diluído em solução de bloqueio. Anticorpos primários utilizados foram: anti-poli-Q (MW1, Coriell, 1:500 ou 3B5H10, Sigma, 1:1000), anti-huntingtina (MAB2166, EMD Millipore, 1:1000 ou Ab1, DiFiglia et al., 1995, 1:1000), anti-DARPP32 (#ab40801, Abcam, 1:10,000), anti-actina (A4700, Sigma, 1:1000), e anti-spectrina (MAB1622, EMD Millipore, 1:4000). Blots foram lavados em TBST, incubados em anticorpos secundários marcados com peroxidase diluído 1:5000 em

solução de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente, lavados em TBST e incubados em substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico (Pierce #34080). As imagens foram obtidas com um sistema de imagens CCD (Alpha Innotech) e Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Densitometria foi realizada sobre as imagens digitais utilizando software ImageJ (NIH). A análise estatística foi realizada utilizando testes t não pareados e os resultados foram expressados como o valor médio para o lado injetado.

Imunoistoquímica para DARPP32, NeuN e Iba1

[000191] Para quantificar as células positivas de DARPP32, cada vigésima secção foi incubada por 3 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% em 1X PBS, vinte minutos em Triton X-100 a 0,5% e, em seguida, quatro horas em soro de cabra normal a 1,5% (Vector Labs, S-1000) em 1X PBS. As secções foram incubadas em anti-DARPP32 (AbCam, ab40801, diluição 1:1.000) em soro de cabra normal a 1,5% durante a noite a 4 °C. As secções foram então incubadas em anticorpo de cabra anti-IgG de coelho biotinilado (Vector Labs, AP-1000, diluição 1:200) em 1X PBS por 10 minutos. As secções foram incubadas com reagente Elite A a 2% e Elite B a 2% do kit Elite Vectastain ABC (Vector Labs, PK-6100) em 1X PBS durante 5 minutos. O kit DAB reforçado com metal (ThermoFisher Scientific, 34065) foi usado para visualizar as células positivas de DARPP32. As secções foram incubadas em 1X 3,3'-diaminobenzidina em tampão de peróxido estável.

[000192] Para quantificar as células positivas de NeuN, cada vigésima secção foi incubada por 3 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% em 1X PBS, vinte minutos em Triton X-100 a 0,5% e, em seguida, durante a noite em soro de cabra normal a 1,5% (Vector Labs, S-1000) em 1X PBS durante a noite. As secções foram incubadas em anti-NeuN (Chemicon, MAB377, diluição 1:1.000) em

soro de cabra normal a 1,5% durante uma hora a 4 °C. As secções foram então incubadas por 40 minutos em uma anti-IgG de camundongo de cabra AF594 fluorescente (ThermoFisher Scientific, A-11005, diluição de 1:2.000) para visualizar os células positivas de NeuN.

[000193] Para quantificar as células positivas Iba1, cada vigésima secção foi incubada por uma hora em uma solução de soro de cabra normal a 5% (Vector Labs, S-1000), albumina sérica bovina a 1% (Sigma, A-3059), Triton-X-100 a 0,2%, e peróxido de hidrogênio a 0,03% em 1X PBS. As secções foram incubadas em anti-Iba1 (Wako Chemicals, 019-19741, diluição 1:1.000) em soro de cabra normal a 5% (Vector Labs, S-1000) e albumina sérica bovina a 1% (Sigma, A-3059) a 4°C durante a noite. As secções foram incubadas em anticorpo de cabra anti-IgG de coelho biotinilado (Vector Labs, AP-1000, diluição 1:200) em 1X PBS por 10 minutos. As secções foram incubadas com reagente Elite A a 2% e Elite B a 2% do kit Elite Vectastain ABC (Vector Labs, PK-6100) em 1X PBS durante 5 minutos. O kit DAB reforçado com metal (ThermoFisher Scientific, 34065) foi usado para visualizar a reação ao incubar a secção em 1X 3',3-diaminobenzidina em tampão de peróxido estável.

[000194] A quantificação de células positivas de DARPP32 e Iba1 no hemisfério direito e esquerdo do cérebro foi feita fazendo imagens (20X para DARPP32 e 40X DARPP para Iba1) com um microscópio Nikon Eclipse E600 de cada secção. A fim de capturar imagens de forma consistente entre as diferentes secções, a primeira imagem foi capturada na borda medial, dorsal do estriado e a platina foi deslocada 0,5 cm para a borda ventral. Uma vez que a borda ventral foi alcançada, a platina foi deslocada 0,5 cm lateralmente e 0,5 cm dorsalmente até dez imagens serem capturadas. Números aleatórios foram atribuídos para cada imagem para eliminar o viés ao quantificar

as células. As células foram contadas utilizando software ImageJ (NIH).

[000195] A quantificação das células positivas NeuN foi realizada usando a Nikon Eclipse E600 com uma lâmpada de mercúrio de 100-W Chiu Technical Corporation a 60X. O método estereológico usado para a captura de imagens de DARPP32 e Iba1 também foi utilizado para quantificar as células positivas NeuN.

[000196] A área do estriado, caudado e putâmen para cada secção foi medida, circulando manualmente as regiões coradas com DARPP32 utilizando software ImageJ (NIH) e nos lados injetados e não-injetado de cada vigésima secção através do estriado (seções 29-35 por lado por animal). O observador foi cegado para as condições. O volume total para cada região foi determinado ao multiplicar a área pela espessura da secção (40 mícrons) pelo número de secções entre as lâminas (20) e adicionando junto para cada animal. A análise estatística foi realizada utilizando o Microsoft Excel, testes t pareados e não pareados, N=3 ou 4 animais por grupo.

Distribuição do genoma do vetor e miRNA após injeção

[000197] O silenciamento de uma huntingtina de camundongo expandida em um modelo knock-in de HD e do mRNA do transgene da mHTT humana em um modelo de camundongo transgênico de HD têm sido observado. Neste exemplo, duas coortes de ovinos HD (estudo 1 e estudo 2) foram injetadas unilateralmente no estriado. No estudo 1, os ovinos foram injetados a 8-9 meses de idade com scAAV9-U6-miRHTT (AAV9miRHTT) ou scAAV9-CBA vazio (AAV9) onde uma sequência de enchedor de não codificação é inserida entre o promotor e o sinal poli-A. No estudo 2 os ovinos foram injetados a 14 meses de idade com scAAV9-CBA-miRHTT ou scAAV9-CBA vazio (AAV9). Os cérebros foram colhidos um e seis meses após a administração de AAV9-miRHTT.

[000198] Cópias do genoma foram determinadas em um subconjunto de regiões (FIG. 26A) por PCR digital em gotas (ddPCR, FIG. 26B). Cópias do genoma foram maiores no caudado e putâmen no lado injetado em comparação com o lado não-injetado e estavam no nível mais alto nos grupos de tratamento scAAV9-U6-miRHTT em 1 e 6 meses pós-injeção. Pequenas quantidades de genoma de vetor estavam presentes no córtex e fígado, mas foram indetectáveis nos adrenais (FIG. 26B).

[000199] A qualidade do RNA foi medida utilizando o analisador de fragmento, que gera uma pontuação, chamada de número de qualidade de RNA (RQN). O RQN é gerado através da análise do eletroferograma e integra uma série de medidas diferentes de integridade do RNA, como a razão entre a linha de base e a nitidez do pico ribossomal 28S e 18S. Geralmente, os escores variam de 0 (completamente degradada) a 10. Amostras com escores maiores que 5 foram utilizadas para analisar os níveis de fita guia do miR artificial. Dois animais do estudo 1 e dois do estudo 2 foram excluídos da análise devido aos baixos escores de RQN. Os níveis das fitas guia do miRNA artificial foram medidos através de ddPCR e normalizados para o let7e* endógeno (FIG. 27). A quantidade relativa de fita antisenso do miR artificial foi 3,5-1000 vezes maior no lado injetado do que no lado não injetado e superior a um mês, em comparação com seis meses pós-injeção. As fitas guias do miRNA foram detectadas em níveis baixos no lado contralateral à injeção com AAV9-miRHTT.

Uma administração única de scAAV9-miRHTT reduz a longo prazo o mRNA da huntingtina mutante humana no caudado e putâmen

[000200] O mRNA da HTT no estriado anterior e medial foi medido usando um ensaio de DNA ramificado (bDNA) que especificamente reconhece o mRNA da HTT humana e não de ovinos. Este ensaio não requer isolamento de RNA e todas as amostras foram incluídas na

análise. Em um mês pós-injeção, mais próxima da injeção no bloco medial, o scAAV9-U6-miRHTT (Estudo 1) reduziu o mRNA da HTT humana por mais de 50% tanto no caudado como no putâmen (FIG. 28). Nenhum silenciamento significativo foi detectado no estriado anterior, que foi mais longe do local da injeção (FIG. 28). No prazo de seis meses pós-injeção, o silenciando do mRNA foi pronunciado no caudado (FIG. 28). Na coorte scAAV9-C β A-miRHTT (Estudo 2), o silenciamento marcado do mRNA da HTT ocorreu no putâmen medial, caudado medial e estriado anterior (FIG. 28) em um mês e no caudado medial e parte do putâmen medial (FIG. 28) no prazo de seis meses pós-injeção. O estriado anterior não mostrou significativa redução em seis meses. Não houve silenciamento significativo do mRNA da HTT de ovinos endógenos (FIG. 29A).

Ensaio de Western blot e ensaio eletroquimioluminescente (ensaio MSD) mostram que scAAV9-miRHTT reduz a proteína huntingtina mutante humana no caudado e putâmen

[000201] A proteína HTT foi detectada por Western blot (FIG. 30) e ensaio eletroquimioluminescente (descobrimento meso-escala (MSD, FIG. 30) nas mesmas preparações da amostra. No estudo 1, o anticorpo 3BH510 que detecta preferencialmente mHTT (HTT mutante) em relação à HTT do tipo selvagem foi utilizado para detectar a proteína mHTT por Western blot (FIG. 30). Um mês após o tratamento com scAAV9-U6-miRHTT, houve uma redução significativa da proteína mHTT no caudado, putâmen e estriado anterior e no putâmen em seis meses pós-tratamento, em comparação ao tratamento com AAV9 faltando o miRHTT. No estudo 2 (FIG. 30, inferior), tratamento com scAAV9-C β A-miRHTT significativamente silenciou mHTT em um mês pós-injeção no putâmen e seis meses pós-injeção no caudado, putâmen e estriado anterior.

[000202] Resultados com o ensaio MSD usando MW1 para detecção

mostrou que o tratamento com scAAV9-U6-miRHTT (estudo 1) reduziu significativamente os níveis de proteína mHTT no caudado, putâmen e estriado anterior em um e seis meses pós-tratamento. ScAAV9-CBA-miRHTT marcadamente silenciou a proteína mHTT no caudado um mês pós-injeção, e no caudado, putâmen e estriado anterior 6 meses após o tratamento (FIG. 31). Esses resultados indicaram que houve boa concordância entre os resultados com o ensaio MSD (FIG. 31) e os obtidos por ensaio de Western blot (FIG. 30).

Tabela 2: Porcentagem média da proteína huntingtina mutante reduzindo por ensaios de Western blot e MSD em Estudos 1 e 2. A proteína huntingtina mutante foi medida por Western blot com anticorpo anti-htt polyQ 3B5H10 no estudo 1 e anticorpos 3B5H10, MAB2166 (anti-HTT443-456), que não reconhece a HTT ovina (Reid et al., 2013), e o anticorpo monoclonal anti-polyQ MW1 no estudo 2. Nos ensaios de MSD, MW1 foi utilizado como o anticorpo de detecção. Esta tabela informa o percentual médio para a redução do mHTT para o caudado, putâmen e estriado anterior. A porcentagem de redução foi calculada dividindo o sinal médio para o lado injetado nos ovinos tratados com AAV9miRHTT pelo sinal médio para o lado injetado nos animais tratados com AAV9 sozinho.

Tabela 1. Porcentagem média da proteína huntingtina mutante reduzindo por ensaios de Western blot e MSD em Estudos 1 e 2.											
Estudo# (promotor)	Estudo 1 (U6)						Estudo 2 (CBA)				
Ensaio	Western blot (3B5H10)		MSD MW1		Western blot (3B5H10)		Western blot (MAB2166)		Western blot (MW1)		MSD MW1
Anticorpo htt mutante											
Intervalo pós-injeção (meses)	1	6	1	6	1	6	1	6	1	6	1
Caudado	78**	30	71**	74**	16	30,43,	61	46, 58*	50*	65*, 70	43* 40*, 47*
Putâmen	61*	47*	73**	50*	40*	55*, 44	68*	65*, 67*	54	51*, 56*	42 63**, 56**
Estriado anterior	63**	22	49*	33	46	60**, 48	46	81*, 62*	-8	74*, 53*	22 62**, 67**

[000203] Uma vez que os anticorpos que detectam mHTT podem ter diferentes sensibilidades, dois outros anticorpos para detectar a proteína humana mHTT por Western blot, MAB2166 e MW1, foram incluídos no estudo 2 (Tabela 2). Na HD, MAB2166 de ovinos transgênicos só reconhece a huntingtina humana e não HTT ovina. MW1 reconhece preferencialmente a região da poliglutamina expandida em Htt e também foi utilizada para a detecção de mHTT no ensaio MSD. A tabela 2 compara a porcentagem média reduzida do mHTT detectado por Western blot com três anticorpos anti-mHTT (3B5H10, 2166 e MW1) e pelo ensaio MSD com MW1 nos estudos 1 e 2. Todos os três anticorpos na análise de Western blot detectaram significativa redução de mHTT em várias regiões neostriatais no estudo 2 (49% a 81%). Resultados da mHTT reduzindo por ensaio MSD foram consistentes quando duas amostras da mesma região estriatal foram analisadas no estudo 2. Uma comparação dos resultados por ensaios de Western blots e MSD com MW1 no estudo 2 é também notável. Houve boa concordância entre os dois métodos diferentes de detecção da mHTT na magnitude da redução de mHTT.

[000204] Pela análise por Western blot, o córtex sobreposto ao estriado injetado com AAV9-miRHTT não mostrou um declínio nos níveis de proteína mHTT comparado com o córtex injetado com AAV9 (FIG. 32A). Um baixo nível de fita guia de mRNA foi detectado no caudado e putâmen no lado contralateral ao estriado injetado com AAV9-miRHTT. Estas regiões não apresentaram níveis reduzidos da proteína mHTT por análise de Western blot (FIG. 32B).

[000205] Para investigar se o tratamento com AAV9-miRHTT contra o gene de HD humana afetou os níveis de HTT ovina endógena, os níveis do transgene mHTT humano com níveis de HTT ovina endógena foram diretamente comparados usando análise de Western blot, aproveitando as diferenças de migração das duas proteínas em

SDS PAGE (FIG. 29B). A análise de Western blot com anticorpo Ab1, que reconhece htt1-17, mostrou que, ao contrário da mHTT humana, a HTT ovina endógena não foi reduzida por tratamento com miRHTT (FIG. 29B).

Neurônios marcados com DARPP32 e volume do estriado não são afetados por tratamento com miRNA

[000206] Para examinar a segurança da injeção de vetores AAV, imunoistoquímica para DARPP32, um marcador de neurônios espinhosos médios, foi realizada e o número de células positivas DARPP32 foi contado. Não houve diferença significativa entre o número de células nos grupos tratados com AAV9-miRHTT e com AAV9 (Tabela 3) e nenhuma diferença significativa entre os grupos de tratamento no número de células manchadas para NeuN, um marcador de células neuronais. Volumes do estriado foram determinados através de medições de área da secção transversal do estriado em seções marcadas com DARPP32 e foram encontrados como inalterados em comparação aos controles após o tratamento com miRNA (Tabela 4).

Tabela 3: Número de células positivas DARPP32 e Neu N. Os dados foram analisados pelo teste t pareado (lado injetado para não-injetado). Uma diferença significativa foi encontrada entre os lados injetados e não injetados apenas em ovinos do tipo selvagem injetados com AAV9-CBA-miRHTT em seis meses pós-injeção, 1p=0,002 pelo teste t pareado.

Estudo# (promotor)	Grupo		Intervalo pós-injeção (meses)	Lado	# de células positivas DARPP32	# de células positivas NeuN
Estudo 1 (U6)	HD	AAV9	1	Inj	4201±389	
				Não inj	4056±488	
				Inj	2819±614	1185±70
				Não inj	3314±364	1368±180
				Inj	4327±1444	
		miRHTT	6	Não inj	4587±838	
				Inj	3884±1222	1547±315
				Não inj	4149±924	1633±262
				Inj	2459±85	1111±314
				Não inj	2324±347	1184±330
Estudo 2 (CBA)	HD	AAV9	6	Inj	2061±321	1404±61
				Não inj	2084±460	1499±46
				esquerdo	1852±232	1440±76
				direito	2047±306	1183±220
				Inj	2121±96	1157±180
		miRHTT	6	Não inj	2148±146	1106±86
				Inj	1799±223	1285±151 ¹
				Não inj	1895±327	1434±142
				esquerdo	1963±181	1188±328
				direito	2101±219	1056±258
Estudo 2 (CBA)	TS	AAV9	6			

Tabela 4: Volume estriatal. O volume foi determinado a partir de áreas da secção transversal de seções 29-35 40µm por lado por animal, N=3 ovinos por grupo. 1p=0,01, 2p=0,03, 3p=0,02, usando um teste t pareado.

			Volume (mm ³), Média±SD		
			Estudo 1 (U6)		Estudo 2 (CBA)
			1 mês pós-injeção	6 meses pós-injeção	6 meses pós-injeção
Caudado	HD	AAV9	Inj	293±54	241±13
			Não inj	300±48	248±17
			% inj/não-inj	97,3±4,2	97,2±3,2
	AAV9 miRHTT		Inj	257±48	302±15
			Não inj	290±48	325±33
			% inj/não-inj	88,6±9,3	93,8±15
	TS	AAV9 miRHTT	Inj		280±79
			Não inj		304±49
			% inj/não-inj		91,1±12
Putâmen	HD	AAV9	Inj		283±67 ¹
			Não inj		309±65
			% inj/não-inj		91,4±2,7
	AAV9 miRHTT		Inj	298±46	247±33
			Não inj	307±52	274±11
			% inj/não-inj	97,0±1,4	90,3±13
	TS	AAV9 miRHTT	Inj	278±57	318±39 ²
			Não inj	285±50	340±45
			% inj/não-inj	97,5±8,9	93,6±1,2
			Inj		89,9±6,9
					292±45

			Volume (mm ³), Média±SD		
			Estudo 1 (U6)		Estudo 2 (CBA)
			1 mês pós-injeção	6 meses pós-injeção	6 meses pós-injeção
Estriado (Pólo Rostral + Caudado + Putâmen)	HD	AAV9	Não inj		
			% inj/não-inj		329±63
			Inj	1041±172	947±28
	AAV9 miRHTT		Não inj	1034±150	1006±49
			% inj/não-inj	101±2,3	94,3±5,6
			Inj	1023±85	1030±31 ³
	TS	AAV9 miRHTT	Não inj	1037±96	1110±31
			% inj/não-inj	98,8±4,7	92,8±1,7
			Inj		1165±145
			Não inj		95,1±4,0
			% inj/não-inj		1159±76
			Inj		1222±116
			Não inj		1210±32
			% inj/não-inj		95,7±3,8

Um aumento transitório da microglia ativada ocorre após a injeção direta com scAAV9

[000207] A localização imuno-histoquímica de Iba1, uma proteína que é localizada para microglia e regulada positivamente mediante a sua ativação, foi investigada. As células marcadas foram identificadas com base na morfologia como microglia em repouso ou ativada (Tabela 5). Injeção de scAAV9-U6-miRHTT ou o correspondente vetor de controle aumentou o número de microglia ativada no lado injetado em um mês pós-injeção, mas seis meses após a injeção os lados injetado e não injetado foram indistinguíveis. No segundo estudo, a resposta microglial foi analisada somente no final do estudo (6 meses), momento em que não houve diferença significativa entre os grupos. Os achados sugerem que o aumento transitório na microglia ativada é independente da carga AAV e pode ocorrer com qualquer vetor ou com cirurgia apenas.

Tabela 5: Número e classificação baseada na morfologia de células positivas IBA1. A análise estatística foi realizada pelo teste t pareado (lado injetado vs. lado não injetado). Um aumento significativo da microglia ativada no lado injetado em comparação com o lado não injetado foi encontrado em ovinos HD injetados com AAV9-U6-miRHTT 1 ($p = 0,01$) e em ovinos do tipo selvagem injetado com AAV9 ($2p = 0,006$) em seis meses. Uma diminuição significativa da microglia em repouso foi encontrada em um mês em ovinos HD injetados com ambos AAV9 ($3p = 0,05$) e AAV9-U6-miRHTT ($4p=0,04$) e um aumento significativo no total de microglia foi encontrado em ovinos HD injetados com AAV9 em seis meses no estudo 2 ($4p = 0,04$). Todas as análises foram feitas pelo teste t pareado comparando o lado injetado com o não-injetado.

Estudo# (promotor)	Grupo		Intervalo pós-injeção (meses)	Lado	# de microglia ativada por Iba1	# de microglia em repouso Iba1	Total # de células positivas Iba1
Estudo 1 (U6)	HD	AAV9	1	Inj	253±178	180±102 ³	433±168
				Não inj	2,0±2	305±70	307±68
		AAV9 miRHTT	6	Inj	29±19	351±104	380±123
				Não inj	12±6	377±214	388±219
		AAV9 miRHTT	1	Inj	195±2	201±77 ⁴	396±135
				Não inj	2,8±3	347±116	350±113
			6	Inj	29±8 ¹	279±202	308±194
				Não inj	6,7±4	311±148	318±144
Estudo 2 (CBA)	HD	AAV9	6	Inj	38±10	263±31	301±23 ⁴
				Não inj	23±3	248±29	271±32
		AAV9 miRHTT	6	Inj	10±4	240±38	251±37
				Não inj	6,0±4	260±32	266±36
		Sem injeção	6	esquerdo	8,3±5	256±90	265±85
				direito	13±17	192±112	204±100
	TS	AAV9	6	Inj	16±4 ²	288±39	303±35
				Não inj	7,0±4	256±50	263±46
		AAV9 miRHTT	6	Inj	22±18	261±29	283±26
				Não inj	8,7±7	303±59	312±55
		Sem injeção	6	esquerdo	10±12	246±108	256±96
				direito	9,3±8	298±63	307±69

[000208] O tratamento com scAAV9-miRHTT não afeta hemograma, eletrólitos ou função renal e hepática.

[000209] Amostras de sangue foram coletadas em quatro momentos: linha de base (pré-tratamento), 28 (ou 30)

dias, 90 dias e 180 dias pós-tratamento. Um hemograma completo, eletrólitos foram medidos, e testes de função hepática e renal foram realizados (Tabela 6). Nenhuma alteração em qualquer dessas medidas foi encontrada entre ovinos injetados com AAV9-miRHTT e controles. Além disso, não houve alterações no peso nesses tempos.

Tabela 6: Patologia clínica e hemogramas completos para todas as ovelhas.

	Linha de base				Dia 28				Dia 90				Dia 180			
	Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste	
	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
Sódio mmol/L	146	19	147	22	148	18	148	20	146	10	145	10	146	10	145	10
Potássio mmol/L	4,14	18	4,15	22	5,26	18	5,17	20	5,21	10	5,38	9	5,21	10	5,38	9
Cloreto mmol/L	105	19	106	22	109	18	109	20	109	10	109	10	109	10	109	10
Bicarbonato mmol/L	27	19	26	22	26	18	26	20	26	10	26	10	26	10	26	10
Ânion mmol/L	18	18	19	22	18	18	18	20	17	10	16	10	17	10	16	10
Glicose mmol/L	4,57	18	4,15	21	2,73	18	3,48	20	2,89	10	2,70	10	2,89	10	2,70	10
Ureia mmol/L	7,56	19	7,44	22	5,46	18	5,24	20	6,08	10	5,75	10	6,08	10	5,75	10
creatinina µmol/L	53	19	51	22	62	18	60	20	57	10	55	10	57	10	55	10
Colesterol mmol/L	1	19	1	22	2	18	1	20	1	10	2	10	1	10	2	10
Osmo mmol/L	291	18	292	22	293	18	294	20	291	10	288	9	291	10	288	9
Urato mmol/L	0,00	19	0,09	22	0,00	18	0,00	20	0,00	10	0,00	10	0,00	10	0,00	10
Fosfato mmol/L	2,31	19	2,31	22	2,09	18	1,97	20	1,95	10	2,14	10	1,95	10	2,14	10
T Cal mmol/L	2,48	19	2,40	22	2,44	18	2,42	20	2,54	10	2,46	10	2,54	10	2,46	10

	Linha de base				Dia 28				Dia 90				Dia 180			
	Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste	
	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
íon Cal mmol/L	1,28	18	1,25	22	1,28	13	1,26	12	1,33	10	1,29	10	1,33	10	1,29	10
albumina g/L	36	19	35	22	35	18	35	20	35	10	35	10	35	10	35	10
Globulina g/L	29	19	29	22	28	18	28	20	28	10	28	10	28	10	28	10
Proteína total g/L	65	19	64	22	63	18	63	20	63	10	64	10	63	10	64	10
Bilirrubina total µmol/L	2	19	1	22	1	18	1	20	0	10	1	10	0	10	1	10
GGT U/L	55	19	58	22	58	18	63	20	47	10	51	10	47	10	51	10
ALP U/L	153	19	140	22	157	18	151	20	202	10	211	10	202	10	211	10
ALT U/L	16	19	16	22	15	18	17	20	21	10	21	10	21	10	21	10
AST U/L	84	19	78	22	82	18	91	20	111	10	107	9	111	10	107	9
LDH U/L	498	18	496	22	532	18	536	20	624	10	577	9	624	10	577	9
Hemoglobina g/L	102	19	100	22	115	18	113	21	115	10	120	10	115	10	120	10
Células de glóbulos vermelhos x10 ¹² /L	9,02	19	9,07	22	10,17	18	10,47	21	10,07	10	10,41	10	10,07	10	10,41	10
Volume de células empacotadas L/L	0,34	19	0,34	22	0,38	18	0,40	21	0,39	10	0,40	10	0,39	10	0,40	10
Volume médio da célula fl	37,71	19	37,97	22	37,79	18	37,94	21	38,39	10	37,92	10	38,39	10	37,92	10
Célula heme média pg	11,28	19	11,08	22	11,36	18	11,30	21	11,44	10	11,52	10	11,44	10	11,52	10
Concentração da célula	299	19	292	22	301	18	298	21	299	10	305	10	299	10	305	10

	Linha de base				Dia 28				Dia 90				Dia 180			
	Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle		Teste	
	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n	Média	n
heme média g/L																
Largura dist da célula vermelha %	20	19	20	22	20	18	20	21	19	10	19	10	19	10	19	10
Plaquetas x10 ⁹ /L	343	16	334	22	397	17	347	20	305	9	241	9	305	9	241	9
Contagem de células brancas 10 ⁹ /L	4,87	19	5,35	22	5,82	18	5,89	21	5,89	10	6,16	10	5,89	10	6,16	10
Neutrófilos %	40	19	41	22	46	18	64	21	40	10	41	10	40	10	41	10
Linfócitos %	58	19	56	22	51	18	51	21	53	10	58	10	53	10	58	10
Monócitos %	1	19	1	22	2	18	2	21	4	10	5	10	4	10	5	10
Eosinófilos %	1	19	1	22	1	18	0	21	4	10	2	10	4	10	2	10
Basófilos %	0	19	0	22	0	18	0	21	0	10	0	10	0	10	0	10

SEQUÊNCIAS

>SEQ ID NO: 1 mRNA da Huntingtina; NCBI Ref. Seq NM_002111.8)

GCTGCCGGACGGTCCAAGATGGACGGCGCTCAGGTTCTGCTTTACCTGCGGCCAGAGCCCCATTCAATTGCC
 CCGGTGCTGAGCGCGCCGCGAGTCGGCCCAGGCCTCCGGGACTGCCGTGCCGGCGGGAGACCAGCATGGCA
 CCCTGGAAAAGCTGATGAAGCCTTCGAGTCCTCAAGTCCTCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
 GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAGCCACCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCC
 CCTCAGCCGCCGCAGGCACAGCGCTGCCTCAGCCGAGCCGCCGCCGCCGCCGCCACCC
 GCCCGCTGTGGCTGAGGAGCCGCTGCACCGACCAAAGAAAGAAACTTCAGCTACCAAGAAAGACCGTGTGAATCA
 TTGTCAGACAATATGTGAAAACATAGTGGCACAGTCAGTCAGAAATTCTCCAGAATTTCAGAAACTCTGGGCATC
 GCTATGGAACCTTTCTGCTGTGAGTCAGTGATGACGAGTCAGATGTCAGGATGGTGGCTGACGAATGCCTCAACA
 AAGTTATCAAAGCTTGATGGATTCTAACCTTCAAGGTTACAGCTCGAGCTCTATAAGGAAATTAAAAAGAATGG
 TGCCCCTCGGAGTTGCGTGCCTGAGGTTGCTGAGCTGGTCACCTGGTCCGGCTCAGAAATGCAGG
 CCTTACCTGGTGAACCTCTGCCGTGCCCTGACTCGAACAAAGCAAGAGACCCGAAGAACATCAGTCAGGAGACCTTGG
 CTGCAGCTGTTCCAAAATTATGGCTCTTGGCAATTTCAGAACATGAAATTAAAGGTTTGTAAAGG
 CTTCATAGCGAACCTGAAGTCAAGCTCCCCCACCATTGGCGACAGCGGCTGGATCAGCAGTGAGCATCTGCCAG
 CACTCAAGAAGGACACAATTTCATAGTGGCTACTAAATGTGCTTCTAGGTTACTCGTTCTGTCGAGGATG
 AACACTCCACTTGCTGATTCTGGCGTGCCTCACCTGAGGTATTGGCCCTGCTGCAGCAGCAGGTCAA
 GGACACAAGCCTGAAAGGAGCTCGGAGTGACAAGGAAATGGAAGTCTCCTCTGCAGAGCAGCTTGT
 CAGGTTATGAACGTGACATTACACAGCACCAAGACCAATGTTGTGACCGGAGCCCTGGAGCTGTTG
 AGCAGCTTCAAGCCTCCACCGAGCTCTGCAAACCCCTGACCGCAGTCGGGGCATTGGCAGCTCACCGC
 TGCTAAGGAGGAGTCTGGTGGCGAAGCCGTAGTGGAGTATTGGAACCTATAGCTGGAGGGGGTCTCATGC
 AGCCCTGTCTTCAGAAAACAAAAGGCAAAGTGTCTTAGGAGAAGAACGCTTGGAGGATGACTCTGAAT
 CGAGATCGGATGTCAGCAGCTGCCTAACAGCCTCAGTGAAGGATGAGATCAGTGGAGAGCTGGCTGCTTCTC
 AGGGGTTCCACTCCAGGGTCAGCAGGTATGACATCACAGAACGCCACGGTCACAGCACACACTGCAGGG
 GACTCAGTGGATCTGGCAGCTGTGACTTGACAAGCTCTGCCACTGATGGGATGAGGAGGATCTGAGGCCACA
 GCTCCAGCCAGGTCAAGCGCCCTCCATCTGACCCCTGCCATGGACCTGAATGATGGGACCCAGGCCTCGCC
 CAGCGACAGCTCCCAGACCACCAGGAAGGGCTGATTCTACAGCTGTTACCCCTCAGACAGTCTGAAATTGTGTTA
 GACGGTACCGACAACCAGTATTGGGCTGCAAGTGGACAGCCCCAGGATGAAGATGAGGAAGCCACAGGTATT
 TTCCTGATGAAGCCTCGGAGGCCTCAGGAACCTTCCATGGCCTTCAACAGGCACATTGAAAACATGAG
 TCACTGCAGGCAGCCTCTGACAGCAGTGTGATAAAATTGTGTTGAGAGATGAAGCTACTGAACGGGTGATCAA
 GAAAACAAGCCTGCCGATCAAAGGTGACATTGGACAGTCACGACTGATGACTCTGCACCTCTGTCCATTGT
 TCCGCCCTTATCTGCTTCGTTTGCTAACAGGGGGAAAATGTGCTGGTCCGGACAGGGATGTGAGGGTCA
 CGTGAAGGCCCTGCCCTCAGCTGTGAGCAGCTGAGGAGCAGCTGAGGAGCAGCTGAGGAGGATCTTCTCAG
 AAAGTCCCTCTGACACCAGGAATACCCCTGAGGAACAGTATGTCTCAGACATCTGAAACTACATCGATCATGG
 ACCCACAGGTTGAGGAGGCCACTGCCATTCTCTGAGGAGCAGCTGAGGAGGATCTTCTGAGGAGGATCTTCT
 CGTGGGAGATTGGATGGGACCCATTAGAACCCCTCACAGGAATACATTTCCTGGCGGATTGCAATTCTTGT
 CGGAAAACACTGAAGGGATGAGTCTCTGTTACTTGCAAGTTAGCTGTACAGCTGTGAGGAACAGTGT
 TCTGCAGCAGCTACAGTGTGAGTTAGGACTGCAAGCTGATCATCGATGTGCTGACTCTGAGGAAACAGT
 GCTGGTGAGGACAGAGCTTGGAAACCCCTGCAAGGAGATTGACTTCAGGCTGGTGGAGCTTTGGAGG
 GAAAACCTACACAGGGGCTCATCATTATAACAGGGTTTTAAAAGTCAAGAAACGAGTGCTCAATAATGTT
 TCCATTGCTGGAGATGAAGACCCAGGGTGCAGACATGTTGCCGAGCATCACTAATTAGGCTTGTCC
 GTTTATAAAATGTGACCAAGGACAAGCTGATCCAGTAGTGGCCGGTGGCAAGAGATCAAAGCAGTGT
 CTTCTCATGCATGAGACGCGAGCCTCCATCTCATTCTCCGGTCAAGCACAATAACCA
 TACTACCAAGCATAACAGACGTCACTATGGAAAATAACCTTCAAGAGTTATTGCAAGCAGTGT
 TCTCATGAACTAAT

CACATCAACCACCAAGAGCACTCACATTGGATGCTGTGAAGCTTGTCTCTTCCACTGCCTCCCAGTTGC
ATTGGAGTTAGGTTGGCACTGTGGAGTCCTCCACTGAGTCAGATGAGTCTAGGAAGAGCTGTACCGTTG
GGATGCCACAATGATTCTGACCCCTGCTCTCGCAGCTGGTCCCATTGGATCTCAGCCCCATCAAGATGCTT
GATTTGGCCGAAACTTGCTTGAGCCAGTGCTCCAAATCTGAGAAGTTCATGGGCTCTGAAGAAGAAGCC
AACCCAGCAGCCACCAAGCAAGAGGAGGTCTGGCCAGCCCTGGGGACCGGGCCCTGGTGCCTGGCCATGGTGGAGCAGC
TCTTCTCTCACCTGCTGAAGGTGATTAACATTGTGCCACGTCCCTGGATGACGTGGCTCTGGACCCGCAATAA
GGCAGCCTTGCTCTCTAAACAAACCCCCCTCTAAGTCCCACCGACGAAAGGGAGGAGAAAGAACAGGA
GAACAAGCATCTGTACCGTTGAGTCCCAGAAAGGCAGTGAGGCCAGTCAGCTTAGACAATCTGATACTCAG
GTCCTGTTACAACAAGTAAATCCTCATCACTGGGGAGTTCTATCATCTCCTCATACCTCAAACATGCATGATGT
CCTGAAAGCTACACACGCTAACTACAAGGTACGCTGGATCTCAGAACAGCACGGAAAAGTTGGAGGGTTCTC
CGCTCAGCCTGGATGTTCTCAGATACTAGAGCTGCCACACTGCAGGACATTGGAAAGTGTGTTGAAGAGA
TCCTAGGATACTGAAATCTGCTTAGTCAGAACATGGCAACTGTTGTGTTAACAAATTGTTGAAGAC
TCTCTTGGCACAACACTGGCCTCCCAGTTGATGGCTATCTCCAACCCAGCAAGTCACAAGGCCAGCACAG
CGCCTGGCTCCAGTGTGAGGCCAGGCTTGTACCAACTGCTTCATGCCCGTACACCCACTTCACCCAGG
CCCTCGCTGACGCCAGCCTGAGGAACATGGTCAGGCCAGGAGAACGACACCTCGGGATGGTTGATGTC
CCAGAAAAGTGTCTACCCAGTTGAAGAACAAACCTCACAGAGTGTACAAAGAACCGTGCAGATAAGAATGCTATTCA
AATCACATTGTTGTTAACCTTTGTTATAAAAGCTTAAACAGTACACGACTACAACATGTGTCAGTTAC
AGAACAGGTTTAGATTGAAACAGTTGAATACATTGAAGTGGCCAGTTAGGGAAATCAGAGGAAATCATTCCA
AACATCTTTCTTGTATTACATCTTATGAACGCTATCATTCAAACAGATCATTGAAATTCTAAATCA
TTCAGCTCTGTGATGGCATGGCCAGTGGAAAGGAAGGCTGTGACACATGCCATACCGCTCTGCAGCCATAGT
CCACGACCTTTGTATTAAGAGGAACAAATAAGCTGATGCAGGAAAGAGCTTGAACACCCAAAAAGAGGTGGT
GTGTCAATGTTACTGAGACTCATCCAGTACCATCAGGTGTTGGAGATGTTCTGCTGCAGCAGTGC
AGGAGAATGAAGACAAGTGGAAAGCAGTGTCTGACAGATAGCTGACATCATCCTCCAAATGTTAGCCAAACAGCA
GATGCACATTGACTCTCATGAAGCCCTGGAGTGTAAATACATTATTGAGATTGGCCCTTCCCTCC
CCGGTAGACATGCTTACGGAGTATGTCGCACTCCAAACACAATGGCGTCCGTGAGCACTGTTCAACTGTGGA
TATCGGAATTCTGCCATTGAGGGTCTGATTCCAGTCAACTGAAGATATTGTTCTCTCGTATTCA
GCTCTCCTCTCCGTATTAATCTCTGTACAGTAATTAAAGGTTAAGAGATGGGACAGTACTTCAACGCTA
GAAGAACACAGTGAAGGGAAACAAATAAGAATTGCCAGAAGAACATTTCAGGTTCTATTACA
GTATTCTTTAGAAGACATTGTTACAAACAGCTGAAGGTGAAATGAGTGAGCAGCAACATACTTCTATTGCA
GGAACATAGGCACACTGCTAATGTGTCGATCCACATCTCAAGTCTGGAATGTTCCGGAGAAC
ACTAGGCTGTTCCGAGTGATGGCTGTGGCGCAGTTCTACACCCCTGGACAGCTGAACTGCGGGCTCGTCCA
TGATCACCAACCCACCGGCCCTGGCTCTGGTGTAGACTGCTGCTCAACCACCCGACTACCGCTG
GTGGCGAGAGTCAGCAGACCCCGAAAAGACACAGTCTGTCAGCACAAAGTTACTTAGTCCCAGATGTC
GAAGAGGAGGATTCTGACTGGCAGCCAAACTGGAATGTGCAATAGAGAAATGAGTACGAAGAGGGCTCTC
TCTCTGTGATTATGTCGAGAACCTCCATGACTCCAGCAGTCAGTACAGGACTTCATCGCGTTCA
TCTGATCAGCCTTCCCACGAGCCTCCAGTACAGGACTTCATCGCGTTCACTGGAACTCTGCTGCCAGCG
CTGTTCATCCAGGCAATTCACTGTCGTTGTGAAACCTTCAACTCCAACCATGCTGAAGAAA
ACTCTTCAGTGTGCTGAGCTGGAGCTGTGCTCACGCTGTATGTGGACAGGCTTGTGCA
TGGAGGGGATCCATCTCAGCCAGTCGGAGCTGTGCTCACGCTGTATGTGGACAGGCTTGTGCA
TGTGCTGGCTCGCATGGTCGACATCCTGCTTGTGCGCCGGTAGAAATGCTCTGGCTGCAA
ATGGCCCAGTTGCAATGGAAGAACTCAACAGAACACTCCAGGAATACCTCAGAGCAGCGGGCTCG
AAAGGCTCTATTCCCTGCTGGACAGGTTCGTCTCTCCACCATGCAAGACTCA
TTCCCACCCGCTGGACGGGATGGCAGCTGTCAGTGGAAACAGTGAGTCCGGACAAAGACTGG
GTACGTTCAACTGCTGAGGCTGGTGAATCGGATTCTGCTGAGAGCTGGTACGGTAC
AAGATATGAATGCCCTCATGATGAACCTGGAGTTCAACCTAACGCTGCTAGCT
CAGCTGCTAACGCTTAAGCCTAGGATGAG

TGAAATTCTGGTGGCCAGAAGAGTGCCCTTTGAAGCAGCCCCGTGAGGTGACTCTGGCCCGTGAGCGGCACC
GTGCAGCAGCTCCCTGCTGCCATCATGTCTCCAGCCCCAGCTGCCCTGCAGAGCCGGCCCTACTGGAGCAAGT
TGAATGATCTGTTGGGGATGCTGACTGTATCAGTCCCTGCCACTCTGGCCGGCCCTGGCACAGTACCTGGT
GGTGGCTCCAAACTGCCAGTCATTGCACCTCCTCTGAGAAAGAGAAGGACATTGTGAAATTCTGGTGGCA
ACCCTGAGGCCCTGCTGCCATTGATCCATGAGCAGATCCCCTGAGCTGGATCTCCAGGCCAGGGCTGGACT
GCTGCTGCCCTGCCCTGAGCTGCCCTGAGCTGGAGCTGGTCTCTCCACAGAGTTGTGACCCACGCCCTGCTC
CCTCATCTACTGTGACTTCATCCTGGAGGCCCTGAGCTGCCAGGCCAGCTGGAGAGCAGCTTCTAGTCCAGAAAGA
AGGACAAATAACCCAAAAGCCATCAGCGAGGAGGAGGAGGAAGTAGATCCAAACACACAGAACCTTAAGTATATCA
CTGCAGCCTGTGAGATGGTGGAGAAATGGTGGAGTCTCTGAGCTGGTCTGGCCTGGTCATAAAAGGAATAG
CGGCGTGCCGGCGTTCTCACGCCATTGCTAAGGAACATCATCATCAGCCTGCCCGCCTGCCCTGTCAACAGC
TACACACGTGTGCCCTACTGGTGTGAGCTGGATGGTACCCAAACCGGGAGGGATTGGCACAGCATTCC
CTGAGATCCCCGTGGAGTCTCCAGGAAAAGGAAGTCTTAAGGAGTTCATCTACCGCATCAACACACTAGGCTG
GACCAGTCGACTCAGTTGAAGAAACTTGGCCACCCCTTGGTGTCTGGTACGCAGCCCTCGTGTGAG
CAGGAGGAGAGCCACCAGAAGAACACAGAGAGGACCCAGATCAACGCTGCCGTGCAGGCCATCACCTCAC
TGGTCTCAGTGAATGACTGTGCCGTGGCGCAACCCAGCTGTAAGCTGCTGGAGCAGCAGCCCCGAAACAA
GCCTCTGAAAGCTCTGACACCAGGTTGGAGGAAGCTGAGCATTATCAGAGGGATTGTGAGCAAGAGATTCAA
GCAATGGTTCAAAGAGAGAAATTGCCACCCATCATTATATCAGGCATGGATCCTGCTCCCTCTGTCTC
CGGCTACTACAGGTGCCCTCATGCCACGAGAAGCTGCTGTACAGATCAACCCGAGCAGGGAGCTGGGAGCAT
GAGCTACAAACTCGGCCAGGTGTCCATACACTCCGTGGCTGGGAAACAGCATCACACCCCTGAGGGAGGAGGAA
TGGGACGAGGAAGAGGAGGAGGCCAGCAGCCCCCTGCACCTCGTACCAACCCACGTCTCAGTCAACTCCAGGA
AACACCGGGCTGGAGTTGACATCCACTCCTGTCGAGTTTGCTGAGTTGTACAGCCGCTGGATCCTGCCGTC
CAGCTGCCAGGAGGACCCGCCATCCTGATCAGTGAGGTGGTCAGATCCCTCTAGTGGTCTCAGACTGTT
ACCGAGCGCAACCAGTTGAGCTGATGTGACGCTGACAGAACTGCGAAGGGTGCACCCCTCAGAACAGCAGA
TCCTCGCTCAGTACCTGGTGCCTGCCACCTGCAAGGCAGCTGCCCTGGATGGACAAGGCCGTGGCGAGCC
TGTCAGCCGCTGCTGGAGAGCACGCTCAGGAGCAGCCACCTGCCAGCAGGGTGGAGGCCCTGCACGGCTCCTC
TATGTGCTGGAGTGCGACCTGCTGGACGACACTGCCAACGCTCATCCGGTCATCAGCAGCTATCTCCCTCCA
ACCTGAAAGGGATGCCACTGCGTAACATTACAGCCAGCAGCACGACTGGTCATGTGCTCCACTGCCCTTAA
CCTCATGGAAACTATCCTCTGGACGTAGGGCCGGATTTCAGCATCAATAATACAGATGTGTTGGGTGATGCTG
TCTGGAAAGTGAGGAGTCCACCCCTCCATCTTACACTGTGCCCTCAGAGGCTGGAGCAGAGTGAACGTGACAGCCGACCG
GCCATGGCGCTCTGGCCTGATGCTCACCTGCATGTACACAGGAAGGAGAAAGTCAGTCCGGTAGAACCTCA
GACCTAATCCTGCAAGCCCCGACAGCGAGTCAGTGATTGTTGCTATGGAGCGGTATCTGTTCTTTGATAGGA
TCAGGAAAGGCTTCCTGTGAAGCCAGAGTGGTGGCCAGGATCCTGCCAGTTCTAGACGACTTCTCCACC
CCAGGACATCATGAACAAAGTCATGGAGAGTTCTGCTCAACCAGCAGCCATACCCCTAGTTCATGCCACCGTG
GTGTATAAGGTGTTCAGACTCTGCACAGCACGGCAGTCGTCATGGTCCAGTGGACTGGTCATGCTGCCCTCT
CCAACCTCACGCAGAGGGCCCCGGCTGCCATGGCACGTGGAGCAGGCTCTGCTTGTCAAGCGCTCCACCAG
CCCGTGGGTCGCGGAGCTCTCCACATGTCACTCAGCAGGATGGCAAGCTGGAGCAGGTGGACGTGAACCTTT
TGCCTGGTCGCCACAGACTCTACAGACACCAGATAGAGGAGGAGCTCGACCGCAGGGCTCCAGTGTGCTTG
AGGTGGTGCAGCCCCAGGAAGCCATATCACCGCTGCTGACTTACGAAATGTCCACAAGGTACCCACTG
CTGAGGCCATGGTGGAGAGACTGTGAGGCCAGCTGGGCCGGAGCCCTTGGAGTCTGCGCCCTTGTGCCCT
GCCCTCCACCGAGCCAGCTGGTCCCTATGGCTTCCGACATGCCCGGGCGGCCAGGCAACGTGCGTGTCTCTGC
CATGTGGCAGAAGTGTCTTGTGGCAGTGGCAGGCAGGGAGTGTCTGCAGTCTGGTGGGCTGAGCTGAGGC
CTTCCAGAAAGCAGGAGCAGCTGCTGCACCCCATGTGGTGGAGCAGGCTTCTCTGATAGTCACCTGCTGG
TTGTTGCCAGGTTGAGCTGCTTGCATCTGGCCAGAACAGTCCCTCCTGCAGGCTGGCTGGTGGGCCCTCTG
CTGTCCTGCAAGAGGTGCCAGTGGGAACTCTGCCCTGGTCTCCCTGGTGGGGTGTGCACTGCC

ACGCCCGTGTGGATGCACAGATGCCATGGCTGTGGCTGGGCACTGGCTGGGGTGCTAGACACCCGGCACCA
TTCTCCCTCTCTTTCTCAGGATTAAAATTAAATTATCATGTAAGAGATAATTAAACTCT
TTCTATGCCGTGTAAAGTATGTGAATCGCAAGGCCTGTGCTGCAGCAGCGTCGGGCTGGACAGGGCC
CCCGGCCACGCTCCCTCCTGTAGCCACTGGCATAGCCCTCCTGAGCACCCGCTGACATTCCGTTGACATGTT
CCTGTTATGCATTACAAGGTGACTGGGATGTAGAGAGGCGTAGTGGCAGGTGGCCACAGCAGGACTGAGGAC
AGGCCCCATTATCCTAGGGTGCCTCACCTGCAGCCCTCCTCGGGCACAGACGACTGTCGTTCCACCC
ACCAGTCAGGGACAGCAGCCTCCCTGCACTCAGCTGAGAAGGCCAGCCCTCCCTGGCTGTAGCAGCCTCCACTG
TGTCCAGAGACATGGCCTCCCACCTCTGCTAGCCCTGGGTGGCGTCTGCCTAGGAGCTGGCTGGCAG
GTGTTGGACCTGCTCCATGGATGCATGCCCTAAGAGTGTCACTGAGCTGTGTTGCTGAGCCTCTCTCG
TCAACAGCAAAGCTTGGTGTCTTGCACTGTTAGTGACAGAGGCCAGCATCCCTCTGCCCCCGTCCAGCTGACA
TCTTGACGGTGACCCCTTTAGTCAGGAGAGTGCAGATCTGTGCTCATGGAGACTGCCCCACGGCCCTGTCAGA
GCCGCCACTCCTATCCCCAGGCCAGGTCCCTGGACCAGCCCTGTTGCAGGCCAGAGGAGCCAAGTCATTAAA
ATGGAAGTGGATTCTGGATGGCGGGCTGCTGCTGATGTAGGAGCTGGATTGGAGCTGCTGCCGACTGGCT
GTGAGACGAGGCAGGGCTCTGCTCCCTAGCCCTAGAGGCGAGCCAGGCAAGGTTGGCGACTGTCATGTGGCT
GTTTGGTCATGCCCGTCACTGGTATTGAATGTGGTAAGTGGAGGAATGTTGGAACTCTGTGAGGTGCT
GCCCTGAGACCCCCAAGCTCCACCTGCTCCCTCCTATGTGGCAGCTGGGAGCAGCTGAGATGTGGACTGTAT
GCTGCCACACATACGTGAGGGGAGCTGAAAGGGAGCCCTCTGAGCAGCCTCTGCCAGGCCTGTATGAGGCT
TTCCCACAGCTCCAACAGAGGCCCTCCCCAGCCAGGACCACCTGCTCTGGCGGGGAGCAGGAGCGTAG
AAAGGGTCCGATGTTGAGGAGGCCCTAAGGGAGCTACTGAATTATAACACGTAAGAAAATCACCATTCCGTA
TTGGTTGGGGCTCTGTTCTCATCCTAGCTTTCCCTGGAAAGGCCGCTAGAAGGTTGGAAACGAGGGAAAG
TTCTCAGAACTGTTGGCTGCTCCCCACCCGCCCTCCGCTCCCCCGCAGGTTATGTCAGCAGCTCTGAGACAGCAG
TATCACAGGCCAGATGTTGTCCTGGCTAGATGTTACATTGTAAGAAATAACACTGTGAATGTAAAACAGAGCC
ATTCCCTGGAATGCATATCGCTGGCTAACATAGAGTTGTCTTCTTACGACGTGATCTAAACCAGT
CCTTAGCAAGGGCTCAGAACACCCCGCTGGCAGTAGGTGCTCCCCACCCCAAAGACCTGCCGTGCTCCG
GAGTAATATGAGCTCATTAGTAAAATGACTTCACCCACGCATACATAAAGTATCCATGCACTGCA
ACACATCTATAATTACACACACACCTCTCAAGACGGAGATGCATGCCCTTAAGAGTGCCGTGCGTTCTC
CTGGAAAGTGTCTTCTTAGACCCGCCAGGTCAAGTTAGCCGCTGACGGACATCCAGGCCGTGGACGTGGTAG
GGCAGGGCTATTCACTGCCCAGGATCCCAGTGGCAAGATGGCTCCATATCAGCTCTGCAAGAGGGAGG
AAGACTTTATCATGTTCTAAAAATCTGTGGCAAGCACCACGTATTATCAAATTGTTGCAAATGTGATTAA
TTTGGTTGTCAAGTTGGGGTGGCTGTTGAGATTGCTTTGTTCTGCTGGTAATATCGGGAAAGATT
TAATGAAACCAAGGGTAGATTGTTGGCAATGCACTGAAGCGTGTCTTCCAAAATGTGCCCTCCCTCCGCTG
CGGGCCCAGCTGAGTCTATGTAGGTGATTTCCAGCTGCCAAGTGTCTTGTACTGTCACCCCTCATTTCTGC
CAGCGCATGTGTCCTTCAAGGGAAAATGTGAAGCTGAACCCCTCCAGACACCCAGAATGTAGCATCTGAGAAG
GCCCTGTGCCCTAAAGGACACCCCTGCCCATCTCATGGAGGGGTCAAGGCCCTGGAGCCAATGAA
CAGCTCCCTCTGGAGCTGAGATGAGCCCCACGTGGAGCTGGACGGATAGTAGACAGCAATAACTCGGTG
TGGCCGCTGGCAGGTGGAACCTCCCTCCGTTGCCGGGGAGTGGAGTTAGTCTGTGTCGGTGGGTGGAGT
CAGGCTCTCTGCTACCTGTGAGCATCCTCCAGCAGACATCCTCATGGCTTGTCCCTCCCCGCTCCT
CCTCTGCCGGAGGACCCGGACCACAGCTGCTGCCAGGGTAGACTGGAGCTGTCCTCAGAGGGTCAGTGT
AGGAGTGAGAAGAAGGAGATCTTGAGAGCTGCTGAGGGACCTGGAGAGCTCAGGATGGCTCAGACGAGGACACT
CGCTTGCCGGGCTGGGCTCTGGGAAGGAGGGAGCTGCTCAGAATGCCGATGACAAGTGAAGGCAACCTGGAA
GGTTCAAGGGGCCGCTCTCCCCCATGTGCCGTGACGCTGGTGCAGTCAGGAAACGCCCTCCCTCAGTTGTT
TCTAAGAGCAGAGTCTCCCGCTGCAATCTGGTGTTAAGTGCAGCAGCTGGAGAGCTGGAGGATCGTGGCAACGTGGACCTG
CTACGGAGGGTGGGCTCTGACCCAAGTGGGGCTCCTGTCCAGGTCTCACTGCTTGACCGTGGTCAGAGGGAC
TGTCACTGAGCTTGAGCTCCCTGGAGGCCAGCAGGGCTGTGATGGCGAGTCCGGAGCCCCACCCAGACCTGAA
TGCTTCTGAGACAAGGGAGGAGCTGACGAGATGTATATTAACTGCTGCAACATGTACATCC

AAATTAAGGAAAAAATGGAAACCATCAAAAAAAAAAAAAA

>SEQ ID NO: 2
TAAATGTGCCTGTTGAAGGGC

>SEQ ID NO: 3
AAGAGGTGCAGAGTCATCATC

>SEQ ID NO: 4
TTCTGGAGGACATCAAACCAT

>SEQ ID NO: 5
TGAACTGGCCCAC TTCAATGT

>SEQ ID NO: 6
TTCCATTGGCAACTGGGCCAT

>SEQ ID NO: 7
TAAGCATGGAGCTAGCAGGCT

>SEQ ID NO: 8
TAGCGTTGAAGTACTGTCCCC

SEQ ID NO: 9
TTGAGGCAGCAGCGGCTGTGC

>SEQ ID NO: 10
TTCATCAGCTTTCCAGGGTC

>SEQ ID NO: 11
TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG

>SEQ ID NO: 12
CCTTGGCACCCGAGAATTCCA

>SEQ ID NO: 13
GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC

>SEQ ID NO: 14
AATGATA CGGCACCACCGAGATCTACACGTT CAGAGTTCTACAGTCCGA

>SEQ ID NO: 15
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATNNNNNGT GACTGGAGTTCC TTGGCACCCGAGAATTCCA

>SEQ ID NO: 16
LOCUS dsCB-GFP-mir155- 5483 bp DNA circular SYN 11-OCT-2012
DEFINIÇÃO Ligação de 6433 em dsCB-GFP-mirFlank-ployA*
ACESSO dsCB-GFP-mir155-
PALAVRAS-CHAVE .
FONTE Desconhecida.
ORGANISMO Desconhecido

Não classificado.

REFERÊNCIA 1 (bases 1 a 5483)

AUTORES Próprio

JORNAL Não publicado.

COMENTÁRIO SECID/Arquivo criado por SciEd Central, Scientific & Educational Software

COMENTÁRIO SECNOTES|Molécula do vetor: dsCB-GFP-mirFlank-ployA*

Terminações do fragmento: BsmBI

Tamanho do fragmento: 5419

Inserir molécula: 6433

Terminações do fragmento:

Tamanho do fragmento: 64

CARACTERÍSTICAS Localização/Qualificadores

```

misc_feature 662..767
    /gene="mutated ITR"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 814..1093
    /gene="CMV enhancer"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 870..899
    /gene="tentative for"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 1100..1126
    /gene="Probe"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 1100..1369
    /gene="B-Actin promoter"
    /product="Chicken"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature complement (1168..1190)
    /gene="rev"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 1435..1465
    /gene="SV40_late_19s_int"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 1435..1531
    /gene="modSV40_late_16s_int"
    /SECDrawAs="Region"
CDS      1605..2314
    /gene="GFP"
    /SECDrawAs="Gene"
misc_feature 2341..2357
    /gene="MCS"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature 2372..2395

```

/gene="5' miR Flank"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 2460..2504
/gene="3' miR Flank"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 2573..2699
/gene="Poly A signal"
/product="Rabbit globin poly A"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature complement (2788..2917)
/gene="3' ITR"
/SECDrawAs="Region"
CDS 3680..4537
/gene="Amp (R)"
/SECDrawAs="Gene"
RIGEM
1 gcccaatacg caaacggcct ctccggcgc gttggccgat tcattaatgc agtgattct
61 aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgttagcgg
121 cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
181 cctagcgccc gtcctttcg ct当地
241 ccgtcaagct ctaaatcggg ggctccctt agggttccga ttttagtgctt tacggcacct
301 cgaccggaaa aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac
361 ggaaaaatcg cctttgcgt tgaggatccac gttcttaat agtggactct tggccaaac
421 tggacaacaaca ctcaacccta tctcgtcta ttctttgtat ttataaggga ttttgcgat
481 ttccggcctat tggtaaaaaa atgagctgtat ttaacaaaaa tttaacgcga attttacaa
541 aatattaacg cttacaattt aaatatttgc ttatacaatc ttccgtttt tggggctttt
601 ctgattatca accgggttac atatgattga catgctagtt ttacgattac cggtcatcgc
661 cctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccggcaaaag cccggcgctc gggcacctt
721 tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtgaaat tcacgcgtgg
781 atctgaattt aattcacgcg tggtacctct ggtcgttaca taacttacgg taaatggccc
841 gctggctga cccggcaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttccat
901 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaaactgc
961 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg cccctattt acgtcaatga
1021 cggtaatgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttatggact ttccctacttg
1081 gcagtgatc tactcgaggg cacgttctgc ttcaactctcc cc当地
1141 ccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttatttgtg cagcgatggg ggcgggggggg
1201 gggggggggc ggcgcggcagg cggggcgaaaa cggggcgagg ggcggggcg ggccggggcgg
1261 agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcgcc ggcgtccgaa agttccctt tatggcgagg
1321 cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga agcgcgcggc gggcgaggc gggatcagcc
1381 accgcggtgtgg cggcctagag tcgacgagga actgaaaaac cagaaaatgtt actggtaagt
1441 tttagtctttt tgcgttttat ttcaagggtccc ggatccgggtg gtggtgcaaa tcaaagaact
1501 gctcctcagt ggttgttgc ttacttcta ggcgttacg gaagtgttac ttctgtctca
1561 aaagctgcgg aattgtaccc gccggccgatc caccggcgtc caccatgggtg agcaaggcgc
1621 aggagctgtt caccgggtg gtgcgcgtt cggatccatcc tggtcgagct ggacggcgcac gtaaacggcc
1681 acaagttcaq cgtatccggc qagggcqaqq qcgtqcac ctacggcaq ctgaccctgt

1741 agttcatctg caccaccggc aagctgccc tgccctggcc caccctcgta accaccctga
 1801 cctacggcgt gcagtgcattc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttctca
 1861 agtccgcccatttccggcagg tacgtccagg agcgcacccat cttcttcaag gacgacggca
 1921 actacaagac ccgcgcggcagg gtgaagttcg agggcgacac cctggtaac cgcatcgagc
 1981 tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact
 2041 acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatac aaggtgaact
 2101 tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccaggcaga
 2161 acaccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacccg agcacccagg
 2221 ccgcctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggctctgctg gagttcgtga
 2281 ccgcgcggcgg gatcactctc ggcattggacg agctgtacaa gtaaagcggc cctagcgaaa
 2341 ccggcgacgg tgcttagcgtc gaccagtggta tcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg
 2401 taagcatggta gctagcaggc tggtttggcc actgactgac agcctgcttccatgcttac
 2461 aggacacaag gcctgttact agcactcaca tggaaacaaat ggcccagatc tggccgcact
 2521 cggaaaacggg ccctctagac tcgaggacgg ggtgaactac gcctgaggat ccgatcttt
 2581 tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagccccctt gacatctga cttctggcta
 2641 ataaaggaaa ttatattttca ttgcaatagt gtgttggaaat tttttgtgtc tctcaactcg
 2701 aagcaattcg ttgatctgaa ttgcgaccac ccataataacc cattaccctg gtagataagt
 2761 agcatggcgg gttaatcatt aactacaagg aacccttagt gatggagttg gccactccct
 2821 ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg ggcgacccaaa ggtcgcccgaa cgcccgccgt
 2881 ttggccggcggc ggcctcagtg agcgagcggcgcct taattaaacct aattactgg
 2941 ccgtcgaaaa acaacgtcgta gactggaaaa accctggcgta tacccaaactt aatcgccctt
 3001 cagcacatcc cccttcgccc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt
 3061 cccaaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat gggacgcgcct ctgtagcggc gcatataagcg
 3121 cggcggtgt ggtggttacg cgacgtcgta ccgctacact tgccagcgcctt ctgcgcggc
 3181 ctcccttcgc tttctccct tccttcgc ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc
 3241 taaatcgaaaa gctccctta gggttccgat ttagtgcattt acggcacccctc gacccaaaa
 3301 aacttgatta gggtgatggt tcacgttagt ggcacatcgcc ctgatagacg gttttcgcc
 3361 ctgtgacgtt ggagtccacg ttcttaataa gtggactctt gttccaaact ggaacaacac
 3421 tcaaccctat ctggcttat tcttttgcatt tataaggat ttgcgcatt tcggccatt
 3481 gttaaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc
 3541 ttacaattta ggtggactt ttccggggaaa tgtgcgcggaa accccctat ttttattttt
 3601 ctaaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaaa tgcttcaata
 3661 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcgt gtcgcctta ttcccttttt
 3721 tgcggcattt tgccttcctg tttttgcattt cccagaaacg ctggtaaaag taaaagatgc
 3781 tgaagatcgat tgggtgcac gagtgggtta catcgactg gatctcaaca gcggtaaagat
 3841 ctttgcggcggc aagaacgttt tccaatgtg agcacttttta aagttctgt
 3901 atgtggcgacgtt gtattatccc gtattgacgc cggcaagag caactcggtc gccgcataca
 3961 ctattctcgt aatgacttgg ttgagttactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg
 4021 catgacagta agagaattat gcagtgcattc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa
 4081 cttacttctg acaacgcgtcg gaggacccaa ggagcttacc gctttttgc acaacatgg
 4141 ggatcatgtatcgtactcgttgc acccgatgc atcgtttggta accggagctg aatgaaggcca taccaaacga
 4201 cgacgtcgac accacgtcg ctgttagcaat ggcaacaacg ttgcgcggaa tattactgg
 4261 cgaactactt actcttagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cgatggaaaat
 4321 tgcaggacca cttctgcgtc cggcccttcc ggctggctgg tttattgcgtt ataaatctgg
 4381 agccgggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcaactg gggccagatg gtaagccctt

4441 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca
 4501 gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc
 4561 atatactactt tagattgatt taaaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat
 4621 ccttttgat aatctcatga cccaaatccc ttaacgttag ttttcgttcc actgagcgtc
 4681 agaccccgta gaaaagatca aaggatctt ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg
 4741 ctgcttgcaa aaaaaaaaaac caccgctacc agcggtagtt tgttgcgg atcaagagct
 4801 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct
 4861 tctagttag ccgttagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacataccct
 4921 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg
 4981 gttggactca agacgatagt taccggataa ggccgcgg tcgggctgaa cgggggggttc
 5041 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgc acataccgaa ctgagatacc tacagcgtga
 5101 gctatgagaa agcgccacgc ttcccgagg gagaaaggcg gacaggtatc cggttaagcgg
 5161 cagggtcggc acaggagagc gcacgaggga gttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta
 5221 tagtcctgtc gggttcgcc acctctgact tgagcgtcga ttttgcgtat gctcgtcagg
 5281 gggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccccc ttacggttcc tggccttttgc
 5341 ctggccccc gtcacatgt tcttcctgc gttatccccct gattctgtgg ataaccgtat
 5401 taccgcctt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcggatc
 5461 agtgagcggag gaagcggaaag agc

>SEQ ID NO: 17

//LOCUS pdsU6-Mir-htt-64 5686 bp DNA circular SYN 17-SEP-2013

DEFINIÇÃO Ligação de 6433 em pU6-miRNAFlank-GFP*

ACESSO pdsU6-Mir-htt-64

PALAVRAS-CHAVE .

FONTE Desconhecida.

ORGANISMO Desconhecido

Não classificado.

REFERÊNCIA 1 (bases 1 a 5686)

AUTORES Próprio

JORNAL Não publicado.

COMENTÁRIO SECID/Arquivo criado por SciEd Central, Scientific & Educational Software

COMENTÁRIO SECNOTES|Molécula do vetor: pU6-miRNAFlank-GFP*

Terminações do fragmento: BsmBI

Tamanho do fragmento: 5622

Inserir molécula: 6433

Terminações do fragmento:

Tamanho do fragmento: 64

CARACTERÍSTICAS Localização/Qualificadores

misc_feature 662..767

/gene="mutated ITR"

/SECDrawAs="Region"

misc_feature 777..1041

/gene="U6 promoter"

/SECDrawAs="Region"

```
misc_signal    1041..1041
    /gene="Pol III Start"
    /product="Transcriptional Start "
    /SECDrawAs="Label"
CDS        1042..1065
    /gene="5' miR Flank'"
    /SECDrawAs="Gene"
CDS        1130..1175
    /gene="mir 3' Flank"
    /SECDrawAs="Gene"
misc_signal    1176..1181
    /gene="Pol III term"
    /product="pol III terminator"
    /SECDrawAs="Label"
misc_feature   1199..1478
    /gene="CMV enhancer"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   1255..1284
    /gene="tentative for"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   1485..1754
    /gene="B-Actin promoter"
    /product="Chicken"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   1485..1511
    /gene="Probe"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   complement (1553..1575)
    /gene="rev"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   1820..1916
    /gene="modSV40_late_16s_int"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   1820..1850
    /gene="SV40_late_19s_int"
    /SECDrawAs="Region"
CDS        1990..2699
    /gene="GFP'"
    /SECDrawAs="Gene"
misc_feature   2726..2737
    /gene="MCS"
    /SECDrawAs="Region"
misc_feature   2776..2902
    /gene="Poly A signal"
    /product="Rabbit globin poly A"
```

/SECDrawAs="Region"
misc_feature complement (2991..3120)
/gene="3' ITR"
/SECDrawAs="Region"
CDS 3883..4740
/gene="Amp (R)"
/SECDrawAs="Gene"

ORIGEM
1 gcccataacg caaacccctt ctccccgcgc gttggccat tcattaatgc agctgattct
61 aacgaggaaa gcacgttata cgtgctcgta aaagcaacca tagtacgcgc cctgttagcgg
121 cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac ggcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc
181 cctagcgcgc gctcccttcg ctttcttccc ttcccttctc gccacgttgc ccggcttcc
241 ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga ttttagtgctt tacggcacct
301 cgaccacaaa aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatgc cctgatagac
361 gggttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tgttccaaac
421 tggacaacaaca ctcaacccta tctcggtcta ttctttgtat ttataaggga ttttgcgat
481 ttcggcctat tggtaaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttAACAA
541 aatattaacg cttacaattt aaatatttgc ttataacaatc ttccgtttt tggttttt
601 ctgattatca accggggta atatgattga catgctagtt ttacgattac cggtcatcgc
661 cctgcgcgc cgtcgctca ctgaggccgc ccggcaaaag cccggcgcgc gggcgcaccc
721 tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgcgc ggcgcagagag ggagtggaaat tctataaaagg
781 tcgggcagga agaggcccta ttcccata ttccttcata tttgcatacgatacaagg
841 ctgttagaga gataattaga attaatttga ctgtaaacac aaagatatttta gtacaaaata
901 cgtgacgttag aaagtaataa ttcttgggt agtttgcagt tttaaaattt tgttttaaaa
961 tggactatca tatgttacc gtaacttggaa agtatttgc tttcttggct ttatataatct
1021 tgtggaaagg acgaaacacc gcctggaggg ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgg
1081 gctagcaggc tggtttggcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac aggacacaag
1141 gcctgttact agcactcaca tggaccaaattt ggccctttt tctagtgta cctctggcgc
1201 ttacataact tacggtaat gggccgcctg gctgaccgc caacgcaccc cggccatttga
1261 cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat
1321 gggtggagta ttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgc
1381 gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggccgc ctggcattat gcccagtaca
1441 tgaccttatg ggactttccct acttggcagt acatctactc gaggccacgt tctgcttcac
1501 tctcccatc tccccccctt ccccaaaaaa aattttgtat ttatatttt tttaattatt
1561 ttgtgcagcg atgggggcgg ggggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg
1621 cgagggcggc ggcggggcga ggcggagagg tgccggcggca gccaatcaga gcccgcgc
1681 ccgaaagttt cctttatgg cgaggcggcg gcggcggcg ccctataaaaa agcgaagcgc
1741 gcggcggcg ggagcggat cagccaccgc ggtggcggcc tagagtcgac gaggaactga
1801 aaaaccagaa agttaactgg taagtttagt cttttgtct ttatattcag gtcccgatc
1861 cggtgttggt gcaaataaa gaactgctcc tcagtgatg ttgccttac ttctaggcct
1921 gtacggaaatgttacttctg ctctaaaagc tgccgaaattt tacccgcggc cgatccaccc
1981 gtcgcacca tggtagccaa gggcgaggag ctgttacccg ggtgtgtgcc catcctgtc
2041 gagctggacg ggcgcgtaaa cggccacaag ttcaagcgtgt cccggcgggg cggggcgc
2101 gccacctacg gcaagctgac cctgaagttt atctgcacca cccgcaagct gcccgtgccc
2161 tggccaccc tcgtgaccac cctgacccatc ggcgtgcgt gttcagccg ctaccccgac

2221 cacatgaagc agcacgactt cttcaagtcc gccatgccc aaggctacgt ccaggagcgc
 2281 accatcttct tcaaggacga cgccaactac aagaccgcg ccgaggtgaa gttcggggc
 2341 gacaccctgg tgaaccgcata cgagctgaag ggcatcgact tcaaggagga cgccaacatc
 2401 ctggggcaca agctggagta caactacaac agccacaacg tctatatcat gggcgacaag
 2461 cagaagaacg gcatcaaggt gaacttcaag atccgcaca acatcgagga cggcagcgtg
 2521 cagctgccg accactacca gcagaacacc cccatcgcc acggccccgt gctgctgcc
 2581 gacaaccact acctgagcac ccagtccgccc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat
 2641 cacatggtcc tgctggagtt cgtgaccgcg gcccggatca ctctcgcat ggacgagctg
 2701 tacaagtaaa gcggccctag cgttccggc gacggtgcta gactcgagga cggggtaac
 2761 tacgcctgag gatccgatct tttccctct gccaaaaatt atggggacat catgaagccc
 2821 cttgagcatc tgacttctgg ctaataaagg aaatttattt tcattgcaat agtgtgttgg
 2881 aatttttgt gtctctca cggaaagcaat tcgttgatct gaatttcgac caccataat
 2941 acccattacc ctggtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca aggaaccct
 3001 agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg cggggcgacc
 3061 aaaggtcgcc cgacgcccgg gcttgcggc ggcggccctca gtgagcgcgac gagcgcgcag
 3121 ccttaattaa cctaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgacttggg aaaaccctgg
 3181 cgttacccaa ctaatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc gtaatagcga
 3241 agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc
 3301 gccctgttagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgggtggg acgcgcagcg tgaccgctac
 3361 acttgccagc gccctagcgc ccgccttcc cgccttccctt cttcccttc tcgcacgtt
 3421 cggcgttcc cccgtcaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc
 3481 tttacggcac ctgcacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtggccatc
 3541 gccctgatag acggtttttc gcccttgac gttggagtcc acgttctta atagtggact
 3601 cttgttccaa actggaaccaa cactcaaccc tatctcggtc tattctttt atttataagg
 3661 gatttgccg atttcggcct attggtaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc
 3721 gaatttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca ctttcgggg aatgtgcgc
 3781 ggaaccccta ttgtttatt tttctaaata cattcaaata tggatccgct catgagacaa
 3841 taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacattc
 3901 cgtgtcgccc ttattccctt tttgcggca tttgccttc ctgttttgc tcacccagaa
 3961 acgctggta aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa
 4021 ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agtttcgccc ccgaagaacg ttttccatg
 4081 atgagcactt taaaagttct gctatgtggc gggatttat cccgtattga cggccggcaa
 4141 gagcaactcg gtcgcgcata acactattct cagaatgact tgggtgatgta ctcaccagtc
 4201 acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc
 4261 atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta
 4321 accgtttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggt ggaaccggag
 4381 ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgttagc aatggcaaca
 4441 acggtcgca aactattaac tggcgaacta cttaactctg cttccggca acaattaata
 4501 gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttctgc gctggccct tccggctggc
 4561 tggtttattt ctgataaattc tggagccggt gacgtgggt ctgcggat cattgcagca
 4621 ctggggccag atggtaagcc ctccctgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca
 4681 actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg
 4741 taactgtcag accaagttta ctcataatata cttagattt atttaaaact tcaatattaa
 4801 tttaaaagga tcttaggtgaa gatcctttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt
 4861 gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaa gtaaaaggatc ttcttgagat

4921 ccttttttc tgcgctaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggt
 4981 gtttggggc cgatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg ctgcaggcaga
 5041 gcgcagatac caaatactgt tcttcttagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac
 5101 tctgttagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt
 5161 ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag
 5221 cggtcggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc
 5281 gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccgaa agggagaaaag
 5341 gcggacaggt atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca
 5401 gggggaaacg cctggtatct ttatagtccgt tcgggttcc gccacctctg acttgagcgt
 5461 cgattttgt gatgctcgtc agggggcgag accatatgga aaaacgcccag caacgcggcc
 5521 ttttacgggt tcctggcctt ttgctggcctt ttgctcaca tggctttcc tgcgttatcc
 5581 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttagt ctgataaccgc tcgcccgcagc
 5641 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtggc gaggaaagcgg aagagc

>SEQ ID NO: 18

LOCUS pCVscAsaq+-mir64 5155 bp DNA circular SYN 17-SEP-2013

DEFINIÇÃO Ligação de 6433 em pCVscAsaq+-mirFlank*

ACESSO pCVscAsaq+-mir64

PALAVRAS-CHAVE .

FONTE Desconhecida.

ORGANISMO Desconhecido

Não classificado.

REFERÊNCIA 1 (bases 1 to 5155)

AUTORES Próprio

JORNAL Não-publicado.

COMENTÁRIO SECID/Arquivo criado por SciEd Central, Scientific & Educational Software

COMENTÁRIO SECNOTES|Molécula do vetor: pCVscAsaq+-mirFlank*

Terminações do fragmento: BsmBI

Tamanho do fragmento: 5090

Inserir molécula: 6433

Terminações do fragmento:

Tamanho do fragmento: 64

CARACTERÍSTICAS Localização/Qualificadores

misc_feature 1..105

/gene="ITR"

/SECDrawAs="Region"

misc_feature 182..449

/gene="CMV"

/product="CMV Enhancer"

/SECDrawAs="Region"

CDS 448..753

/gene="CB promoter"

/product="Promoter Eukaryotic"

/SECDrawAs="Gene"

```

CDS      754..1819
/gene="Intron"
/product="Intron"
/SECDrawAs="Gene"
CDS      1820..1839
/gene="MCS"
/SECDrawAs="Gene"
misc_feature 1843..1847
/gene="'''MCS"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 1862..1885
/gene="5'miR Flank'"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 1950..1994
/gene="3'miR Flank"
/SECDrawAs="Region"
CDS      2002..2128
/gene="RBG pA"
/product="PolyA Signal"
/SECDrawAs="Gene"
misc_feature complement (2002..2128)
/gene="RBG\pA"
/SECDrawAs="Info only"
misc_feature 2139..2281
/gene="3'ITR"
/SECDrawAs="Region"
CDS      2317..2509
/gene="lacZ"
/SECDrawAs="Gene"
CDS      2510..2965
/gene="f1 ori"
/SECDrawAs="Gene"
misc_feature 3097..3957
/gene="bla-AmpR"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 4117..4731
/gene="rep-pMB1"
/SECDrawAs="Region"

ORIGEM
1 ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgacctt
61 ggtcgccccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcaagagagg gagtgttagcc atgctctagg
121 aagatcaatt caattcacgc gtcgacattt attattgact agctctggtc gttacataac
181 ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattt acgtcaataa
241 tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt
301 atttacggta aactgcccac ttggcagttt atcaagtgtt tcatatgcca agtccggccc

```

361 ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgacacctac
421 gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg
481 tgagccccac gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctcccccaccc ccaattttgt
541 atttattttat ttttaatta ttttgtcag cgatgggggc gggggggggg gggggggcgcg
601 cgccaggcg ggccggggcgg ggcgaggggc gggcggggc gaggcggaga ggtgcggcg
661 cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccctttat ggcgaggcgg cggcggcg
721 ggcctataaa aaagcgaagc gcgcggcgccc cggagtcgc tgcgctgc ctccggcc
781 tgcccgctc cgccgcccgc tcgcgcgc cgcggcgct ctgactgacc gcgttactcc
841 cacaggttag cggcgggac ggcccttctc ctccggcgta taattagcgc ttggtttaat
901 gacggcttgt ttctttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt
961 tgtgcgggggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgt tgcgtgtgg gagcggcc
1021 tgcggctccg cgctgcccgg cggctgttag cgctgcggc gcggcgccgg gcttgcgc
1081 ctccgcagtgc tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg ccccgcggtg cgggggggg
1141 tgcgaggggaa acaaaaggctg cgtgcgggggt gtgtgcgtgg ggggggtgagc aggggggtgt
1201 ggcgcgtcgg tcgggctgca accccccctg caccggccctc cccgagttgc tgagcacggc
1261 ccggcttcgg gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgccgg ggctgcgcgt gcccggcg
1321 ggggtggcgcc aggtgggggt gccggcgccgg gcggggccgc ctcgggcccgg ggaggcg
1381 ggggaggggc gcggcgccccc ccggagcgcc ggccgctgtc gaggcgcggc gagccgc
1441 cattgcctt tatgtaatc gtgcgagagg gcgcaggac ttcccttgta ccaaattctgt
1501 gcggagccga aatctggag ggcgcgcgc accccctcta gcgggcgcgg ggcgaagcgg
1561 tgcggcgccg gcaggaagga aatggcgccg gagggccctc gtgcgtcgcc gcgcgc
1621 ccccttcctcc ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg acggctgcct tcgggggg
1681 cggggcaggc cggggttcgg cttctggcggt gtgaccggcg gctctagagc ctctgcta
1741 catgttcatg cttcttctt tttcctacag ctccctggca acgtgcgtgt tattgtgt
1801 tctcatcatt ttggcaaaga attcatcgat accgtcgacg atctagcgta gaccagtgg
1861 tcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga gctagcaggc tggtttggcc
1921 actgactgac agcctgctct ccatgcttac agacacaag gcctgttact agcaactcaca
1981 tggaaacaaat gcccagatc cgatctttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg
2041 aagcccttg agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttatttcat tgcaatagtg
2101 tgttgaaatt ttttgtgtct ctcactcgat cagatctgag gaacccctag tgatggagtt
2161 gcccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc gcccggccaa agccggcg
2221 tcgggcacc tttggtcgcc cggcctcagt gagcgcgcga ggcgc
2281 ccccccccccc cccccccct gcattctaga gagctccaaat tcgcctata tgagtcgta
2341 ttacgcgcgc tcactggccg tcgtttaca acgtcgac tggaaaacc ctggcg
2401 ccaacttaat cgccttgcag cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc
2461 ccgcaccgat cgccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatgga aattgt
2521 gttaaatattt tgtaaaatt cgcgttaat tttgttaaa tcagctcatt ttttaaccaa
2581 tagggcggaaa tcggcggaaa cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat aggggt
2641 gttgttccag tttggaaacaa gagtcacta taaaagaacg tggactccaa cgtcaaagg
2701 cgaaaaaccg tctatcaggcg ccatggccca ctacgtgaac catcacccta atcaagttt
2761 ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaccctaa aagggagccc cggat
2821 gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaaggaag ggaagaaagc gaaaggagcg
2881 ggcgcctaggc cgctggcaag tgcgtggc acgctgcgcg taaccacc
2941 cttaatgcgc cgcgtcaggc ggcacttttc gggaaatgt ggcggaaacc
3001 cctattgtt tattttctta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc

3061 tgataaaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca tttccgtgtc
 3121 gcccttattc cttttttgc ggcattttgc ctccctgtt ttgctcaccc agaaacgctg
 3181 gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttt ggtgcacgag tgggttacat cgaactggat
 3241 ctcaacagcg gtaagatcct tgagagttt ccccccaag aacgtttcc aatgatgagc
 3301 acttttaaag ttctgctatg tggcgcggta ttatcccgta ttgacgcgg gcaagagcaa
 3361 ctcggcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggtt agtactcacc agtcacagaa
 3421 aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca gtgctccat aaccatgagt
 3481 gataaacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag gaccgaagga gctaaccgct
 3541 ttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgc tttgggaacc ggagctgaat
 3601 gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg tagcaatggc aacaacgtt
 3661 cgcaaactat taactggcg actacttact cttagttccc ggcaacaatt aatagactgg
 3721 atggaggcg ataaagttgc aggaccatt ctgcgctcg cccttccggc tggctggttt
 3781 attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggtctcggt gtatcattgc agcactgggg
 3841 ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg
 3901 gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg
 3961 tcagaccaag tttactcata tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa
 4021 aggatctagg tgaagatcct tttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt
 4081 tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcctt agatcctttt
 4141 tttctgcgta taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt
 4201 ttgccggatc aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag
 4261 ataccaaata ctgtccttct agttagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta
 4321 gcaccgccta catacctcgc tctgctaatt ctgttaccag tggctgctgc cagtgccgat
 4381 aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggcgt
 4441 ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta caccgaactg
 4501 agataacctac agcgtgagct atgagaaaagc gccacgcttc ccgaaggagaa aagggcggac
 4561 aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgcgca cgagggagct tccaggggg
 4621 aaccccttgtt atctttatag tcctgtcggtt tttcgccacc tctgacttgc gctgtcgat
 4681 ttgtgatgct cgtcagggggg gcggagccta tgaaaaaacg ccagcaacgc ggcctttta
 4741 cggccctgg cttttgctg gcctttgct cacatgttct ttccctgcgtt atccctgtat
 4801 tctgtggata accgttattac cgccttgag tgagctgata ccgctcgccg cagccgaacg
 4861 accgagcgcga gcgagtcagt gagcggagaa gcggaaagagc gccaataacg caaacccgcct
 4921 ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc agtggcacg acaggttcc cgactggaaa
 4981 gcggccagtg agcgcacgc aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggt
 5041 ttacacttta tgcttccggc tcgtatgtt tggatattg tgagcggata acaatttcac
 5101 acaggaaaca gctatgacca tgattacgcc agatttaatt aaggcctaa ttagg

>SEQ ID NO: 19

LOCUS U6-mir6433-BGHpA 5223 bp DNA circular SYN 12-SEP-2013

DEFINIÇÃO Ligação de dsAAV CB MCS** em U6-MirBA-6433-GFP**

ACESSO U6-mir6433-BGHpA

PALAVRAS-CHAVE .

FONTE Desconhecida.

ORGANISMO Desconhecido

Não classificado.

REFERÊNCIA 1 (bases 1 a 5223)

AUTORES Próprio
 JOURNAL Não publicado.

COMENTÁRIO SECID/Arquivo criado por SciEd Central, Scientific & Educational Software

COMENTÁRIO SECNOTES|Molécula do vetor: U6-MirBA-6433-GFP**
 Terminações do fragmento: blunt e EagI
 Tamanho do fragmento: 4954
 Inserir molécula: dsAAV CB MCS**
 Terminações do fragmento: EagI e blunt
 Tamanho do fragmento: 269

CARACTERÍSTICAS Localização/Qualificadores

```

misc_feature 662..767
    /gene="mutated ITR"
    /SECDrawAs="Region"

misc_feature 777..1041
    /gene="U6 promoter"
    /SECDrawAs="Region"

misc_signal 1041..1041
    /gene="Pol III Start"
    /product="Transcriptional Start"
    /SECDrawAs="Label"

CDS 1042..1065
    /gene="5' miR Flank"
    /SECDrawAs="Gene"

CDS 1130..1175
    /gene="miR 3' Flank"
    /SECDrawAs="Gene"

misc_signal 1176..1181
    /gene="Pol III term"
    /product="pol III terminator"
    /SECDrawAs="Label"

misc_feature 1199..1478
    /gene="CMV enhancer"
    /SECDrawAs="Region"

misc_feature 1255..1284
    /gene="tentative for"
    /SECDrawAs="Region"

misc_feature 1485..1511
    /gene="Probe"
    /SECDrawAs="Region"

misc_feature 1485..1754
    /gene="B-Actin promoter"
    /product="Chicken"
    /SECDrawAs="Region"

misc_feature complement (1553..1575)
  
```

```

/gene="rev"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 1820..1850
/gene="SV40_late_19s_int"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 1820..1916
/gene="modSV40_late_16s_int"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 2034..2230
/gene="BGHpA"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 2263..2274
/gene="'MCS'"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature 2313..2439
/gene="Poly A signal"
/product="Rabbit globin poly A"
/SECDrawAs="Region"
misc_feature complement (2528..2657)
/gene="3' ITR"
/SECDrawAs="Region"
CDS      3420..4277
/gene="Amp (R)"
/SECDrawAs="Gene"

ORIGEM
1 gccaatacgc aaaccgcct ctcccgccgc gttggccgat tcattaatgc agctgattct
61 aacgaggaaaa gcacgttata cgtgctcgtc aaagcaacca tagtacgcgc cctgttagcgg
121 cgcattaagc gcggcggtg tggtggttac gcgacgcgtg accgctacac ttgccagcgc
181 cctagcgccc gtcctttcg ctttcttccc ttccttctc gccacgttgc ccggctttcc
241 ccgtcaagct ctaaatcgaa ggctccctt agggttccga ttttagtgctt tacggcacct
301 cgacccaaaa aaacttgatt aggggtatgg ttcacgttgtt gggccatcgc cctgatagac
361 ggttttcgc ctttgacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tgttccaaac
421 tggacaaca ctcaccccta tctcggtcta ttctttgtat ttataaggaa ttttgccgat
481 ttcggccat tggtaaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaaacaa
541 aatattaacg cttacaattt aaatatttgc ttatacaatc ttccctgttt tggggctttt
601 ctgattatca accggggta atatgattga catgcttagtt ttacgattac cgttcatcgc
661 cctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc gggcgacctt
721 tggtcggcccg gcctcagtga gcgagcgcgc ggcgcagagag ggagtggaaat tctataaaagg
781 tcggggcagga agagggccta tttccccatga ttccttcata tttgcatata cgataacaagg
841 ctgttagaga gataattaga attaatttgc ctgtaaacac aaagatatta gtacaaaata
901 cgtgacgtaa agagtaataa tttcttggtt agttgcagt tttaaaatta tgttttaaaa
961 tggactatca tatgcttacc gtaacttgcgaa agtatttcga tttcttggtt ttatatatct
1021 tgtggaaagg acgaaacacc gcctggaggc ttgctgaagg ctgtatgctg taagcatgga
1081 gctagcaggc tgttttggcc actgactgac agcctgctct ccatgcttac aggacacaag
1141 gcctgttact agcactcaca tggaaacaat gcccctttt tctagtggta cctctggcgtc

```

1201 ttacataact tacggtaaat ggccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga
 1261 cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat
 1321 gggtaggtt tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa
 1381 gtacgcggcc tattgacgtc aatgacggta aatggccgcg ctggcattat gcccagtaca
 1441 tgacccttatg ggactttccct acttggcagt acatctactc gaggccacgt tctgcttcac
 1501 tctccccatc tccccccctt ccccccccccc aattttgtat ttatTTTTTT ttaattatt
 1561 ttgtgcagcg atggggcg gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg
 1621 cgaggggcgg ggcggggcgaa ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgc
 1681 ccgaaagttt cttttatgg cgaggcggcg ggggcggcg ccctataaaa agcgaagcgc
 1741 gcggcggcg ggagcgggat cagccaccgc ggtggcggcc tagagtcgac gaggaactga
 1801 aaaaccagaa agttaactgg taagtttagt ctTTTTGTCT tttatTTTCAg gtcccgatc
 1861 cggtggtgtt gcaaataaa gaactgctcc tcagtggatg ttgccttac ttctaggcct
 1921 gtacggaaat gttacttctg ctctaaaagc tgcggattt taccgcggc cgcgtttaaa
 1981 ccctgcaggt ctagaaagct tatcgatacc gtcgactaga gctcgctgat cagcctcgac
 2041 tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccttcc cccgtgcctt ccttgaccct
 2101 ggaaggtgcc actccactg tccttcccta ataaaaatgag gaaattgcat cgcattgtct
 2161 gagtaggtgt cattctattt tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattt
 2221 ggaagacaat agcagggtac aagtaaaagcg gccctagcgt ttccggcgcac ggtgctagac
 2281 tcgaggacgg ggtgaactac gcctgaggat ccgatcttt tccctctgcc aaaaattatg
 2341 gggacatcat gaagccctt gaggcatctga ctctggcta ataaaggaaa tttatTTTCA
 2401 ttgcaatagt gtgttggat tttttgtgtc tctcactcgg aagcaattcg ttgatctgaa
 2461 ttgcaccac ccataataacc cattaccctg gtagataagt agcatggcg gttaatcatt
 2521 aactacaagg aacccttagt gatggagttt gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc
 2581 actgaggccg ggcgacccaaa ggtcgcccgaa cggccggcgtt ttgcccgggc ggcctcagtg
 2641 agcgagcgag cgccgcgcct taattaacct aattcactgg ccgtcgctt acaacgtcgt
 2701 gactggaaa accctggcgt tacccaactt aatgcgcctt cagcacatcc cccttcgccc
 2761 agctggcgta atagcgaaga gggccgcacc gatgcgcctt cccaaacagtt ggcgagcctg
 2821 aatggcgaat gggacgcgcctt ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg
 2881 cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcctt ctgcgcggc ctcccttcgc tttctccct
 2941 tccttctcg ccacgttcgc cggcttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta
 3001 gggttccgat ttagtgcctt acggcacctc gaccccaaaa aacttgat tttttttttt ggtgtatgg
 3061 tcacgtatgtt ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcctt ctttgacgtt ggagtccacg
 3121 ttctttaata gtggactctt gttccaaactt ggaacaacac tcaaccctat ctcggcttat
 3181 tcttttgatt tataaggat tttgccatt tcggcctatt ggtaaaaaaaaa tgagctgatt
 3241 taacaaaaat ttaacgcgaa tttaacaaa atattaacgc ttacaatttta ggtggcactt
 3301 ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaataatcat tcaaataatgt
 3361 atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta
 3421 ttagtattca acatttcgt gtcgccttta ttccctttt tgccgcattt tgcccttcgt
 3481 tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac
 3541 gagttgggtt catcgaactg gatctcaaca gcccgtaaat ctttgagatgtt tttcgccccc
 3601 aagaacgttt tccaatgatg agcaacttta aagttctgtt atgtggcgccg gtattatccc
 3661 gtattgacgc cgggcacagag caactcggtc gcccgcataca ctattctcag aatgacttgg
 3721 ttgagttactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat
 3781 gcagtgcgtc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacatcg
 3841 gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgcccttgc

3901 atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc
 3961 ctgttagaat gcacaacaac ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt
 4021 cccggcaaca attaatagac tggatggagg cgatcaaagt tgcaggacca cttctgcgt
 4081 cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaaatctgg agccggtag cgtgggtctc
 4141 gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca
 4201 cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct
 4261 cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atataactt tagattgatt
 4321 taaaactca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ctttttgat aatctcatga
 4381 cccaaatccc ttaacgtgag tttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca
 4441 aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa aaaaaaaaaac
 4501 caccgctacc agcggtggtt tggttgcgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg
 4561 taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgtag ccgtagttag
 4621 gccaccactt caagaactct gtacgaccgc ctacataacct cgctctgcta atcctgttac
 4681 cagtggtgc tgccagtggc gataagtctg gtcttaccgg gttggactca agacgatagt
 4741 taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg
 4801 agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc
 4861 ttcccgagg gagaaggcg gacaggtatc cgtaagcgg cagggtcgga acaggagagc
 4921 gcacgaggga gcttccaggg gaaacgcct ggtatctta tagtcctgtc gggttcgcc
 4981 acctctgact tgagcgtcga tttttgtat gtcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa
 5041 acgccagcaa cgcggcctt ttacggttcc tggcctttt ctggccttt gctcacatgt
 5101 tcttcctgc gttatccccct gattctgtgg ataaccgtat taccgcctt gagtgagctg
 5161 ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtc agtgagcggag gaagcggaaag
 5221 agc

>SEQ ID NO: 20 Proteína do capsídeo AAV9

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQNARGLVLPGYKYLGPNGLDKGPVNAADAALEHD
 KAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEGQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAKTAPGKKRPVEQSPQE
 PDSSAGIGKSGAQPAKKRNLNFQGTGDTESVPDPQPPIGEPPAAPSIVGSILTMASGGAPVADNNNEGADGVGSSSGNW
 HCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINN
 NWGFRPKRLNFLNIQVKEVTDDNNGVKTIANNLTSTVQVFTSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
 TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEVENVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYLSKTINGSGQ
 NQQTLKFVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGED
 RFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQATGWVQNQGILPGMVQ
 DRDVYLQGPIWAKIPTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKKDKLNSFITQYSTGQVSVEIE
 WELQKENSKRWNPEIQTTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

>SEQ ID NO: 21

GCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTAAGCATGGAGCTAGCAGGCTTTGGCCACTGACTGACAGCCTG
 CTCTCCTAGCTTACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACATAACAAATGGCCCTTT

>SEQ ID NO: 22

GCTCGAGTGAGCGCAGCCTGCTAGCTCATGCTTACTGTAAAGCCACCAGATGGTAAGCATGGAGCTAGCAGGCT
 TCGCCTACTAGTTT

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende um transgene codificando um ou mais miRNAs maduro, de fita simples, em que cada ácido nucleico do transgene codificando cada miRNA maduro, de fita simples compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 7, e é flanqueado por uma sequência de estrutura heterológa do miRNA, em que o transgene compreende um promotor e em que um ou mais miRNAs são capazes de reduzir a expressão de huntingtina humana (HTT).

2. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cada sequência de estrutura heterológa do miRNA é uma sequência de estrutura mir-155, uma sequência de estrutura mir-30 ou uma sequência de estrutura mir-64.

3. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o promotor é um promotor da beta-actina de frango (CBA) ou um promotor U6.

4. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o transgene compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 21 ou 22.

5. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o transgene é flanqueado por repetições terminal invertidas (ITRs) do vírus adenoassociado (AAV) ou variantes das mesmas.

6. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a variante ITR carece de um sítio de resolução terminal funcional (TRS).

7. Ácido nucleico isolado, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a variante ITR carecendo de TRS é uma ITR ΔTRS.

8. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende um

ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 1, que compreende um transgene codificando um ou mais miRNAs maduro, de fita simples, em que cada ácido nucleico do transgene codificando cada miRNA maduro, de fita simples compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 7, e é flanqueado por uma sequência de estrutura heterológa do miRNA, em que o transgene compreende um promotor e em que um ou mais miRNAs são capazes de reduzir a expressão de huntingtina humana (HTT).

9. Vetor, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o vetor é um plasmídeo.

10. Vetor, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que cada sequência de estrutura heterológa do miRNA é uma sequência de estrutura mir-155, uma sequência de estrutura mir-30 ou uma sequência de estrutura mir-64.

11. Vetor, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o promotor é um promotor da beta-actina de frango (CBA) ou um promotor U6.

12. Vetor, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o transgene compreende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 21 ou 22.

13. Vetor, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o transgene é flanqueado por repetições terminal invertidas (ITRs) do vírus adenoassociado (AAV) ou variantes das mesmas.

14. Vetor, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a variante ITR carece de um sítio de resolução terminal funcional (TRS).

15. Vetor, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a variante ITR carecendo de TRS é uma ITR ΔTRS.

16. AAV recombinante (rAAV), caracterizado pelo fato de

que comprehende:

(i) uma proteína do capsídeo; e,
(ii) um ácido nucleico isolado, como definido na reivindicação 1, que comprehende um transgene codificando um ou mais miRNAs maduro, de fita simples, em que cada ácido nucleico do transgene codificando cada miRNA maduro, de fita simples comprehende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 7, e é flanqueado por uma sequência de estrutura heterológa do miRNA, em que o transgene comprehende um promotor e em que um ou mais miRNAs são capazes de reduzir a expressão de huntingtina humana (HTT).

17. rAAV, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o transgene é flanqueado por sequências ITR de AAV de comprimento total.

18. rAAV, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o transgene é flanqueado por um AAV ITR de comprimento total e uma ITR ΔTRS.

19. rAAV, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a proteína do capsídeo é uma proteína do capsídeo AAV9.

20. rAAV, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a proteína do capsídeo comprehende a sequência apresentada na SEQ ID NO: 20.

miRNA 6433 artificial alvejando a huntingtina humana
reduz a huntingtina na cultura celular

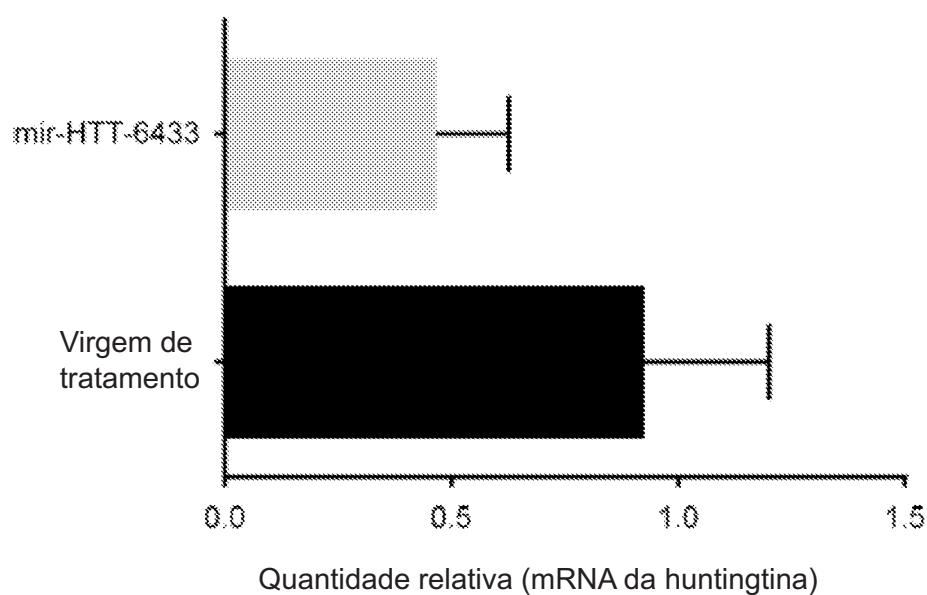


FIG. 1

miRNA 6433 artificial alvejando a huntingtina humana reduz a huntingtina mutante
in vivo em um modelo transgênico da doença de Huntington

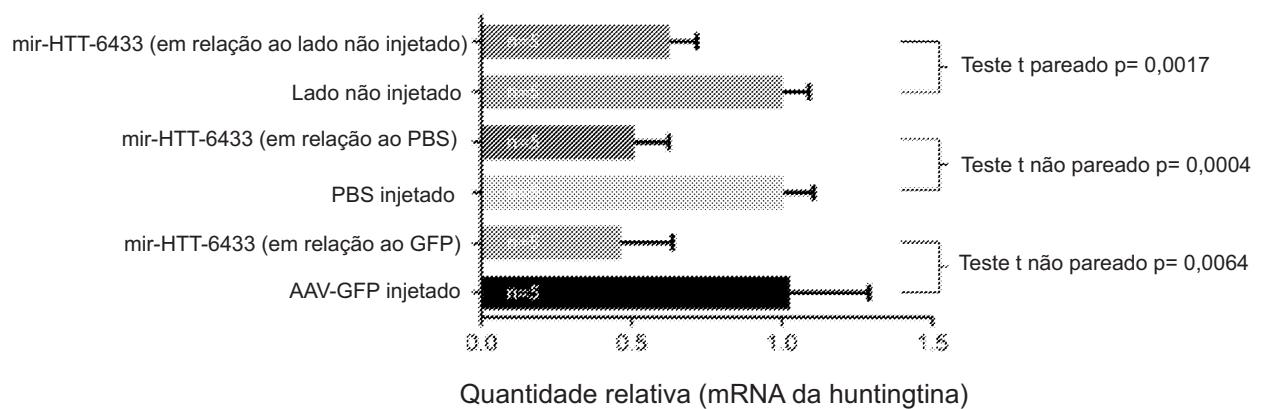


FIG. 2

Tratamento com mir-HTT-6433 melhora o desempenho na trave em camundongos transgênicos expressando a huntingtina humana mutante

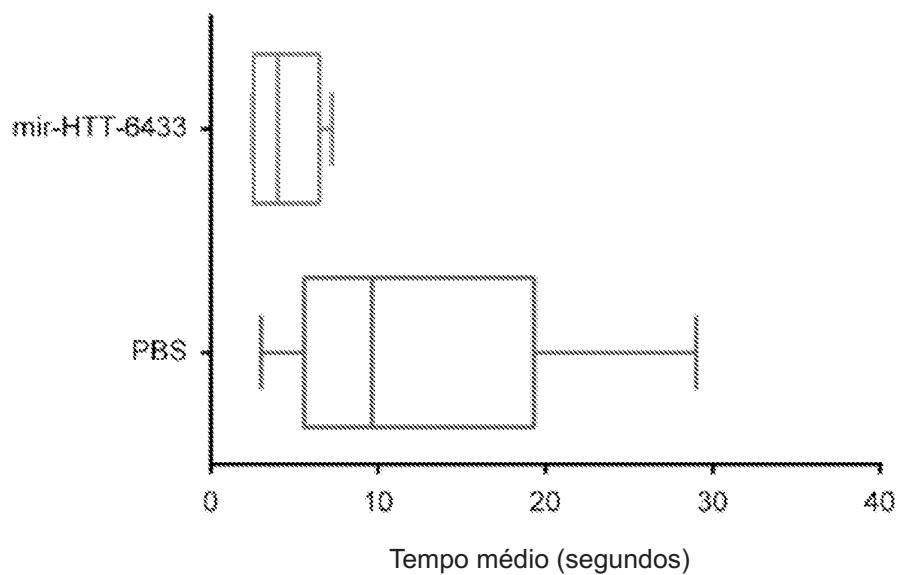


FIG. 3

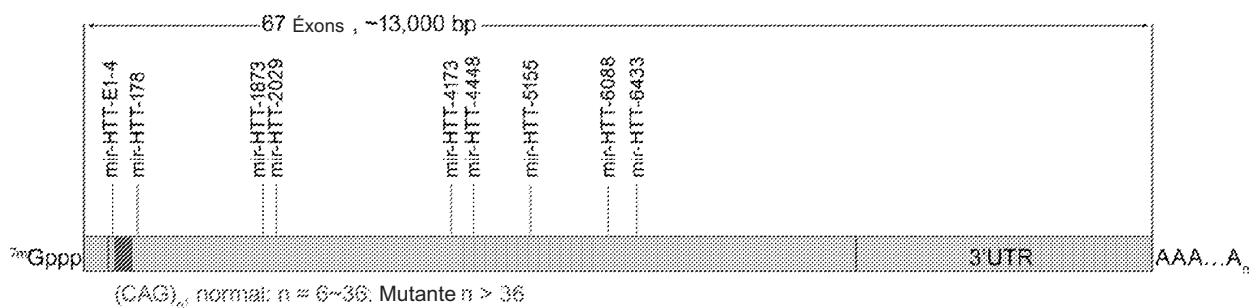


FIG. 4A

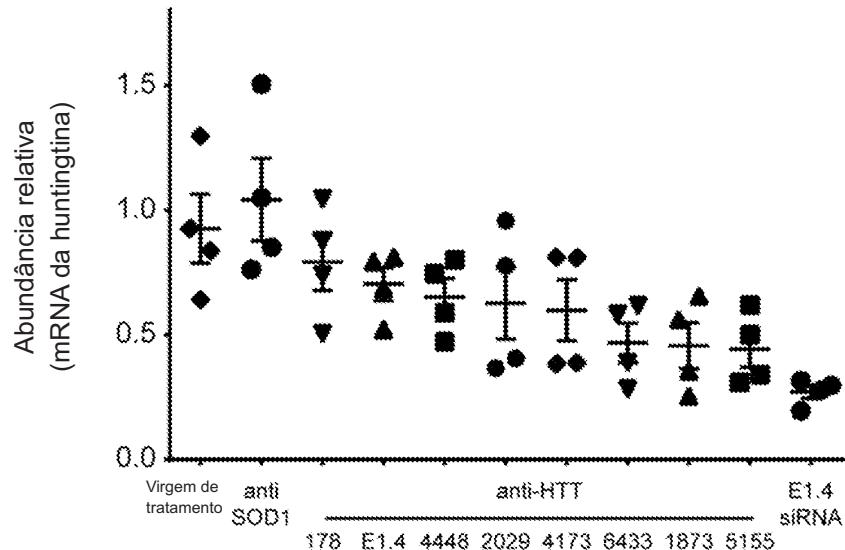


FIG. 4B

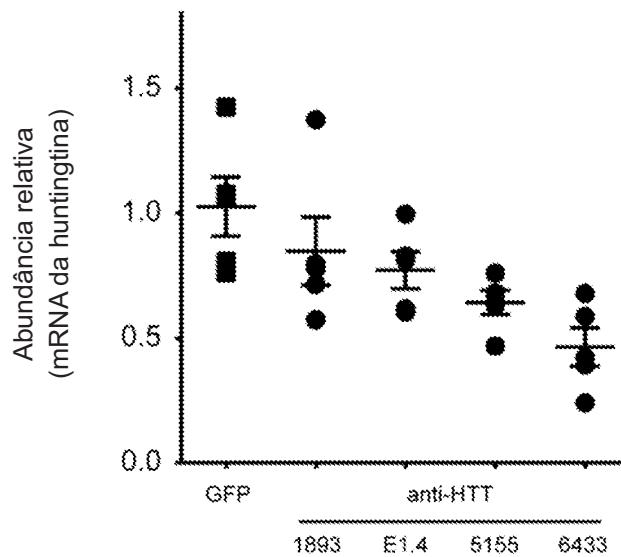


FIG. 4C

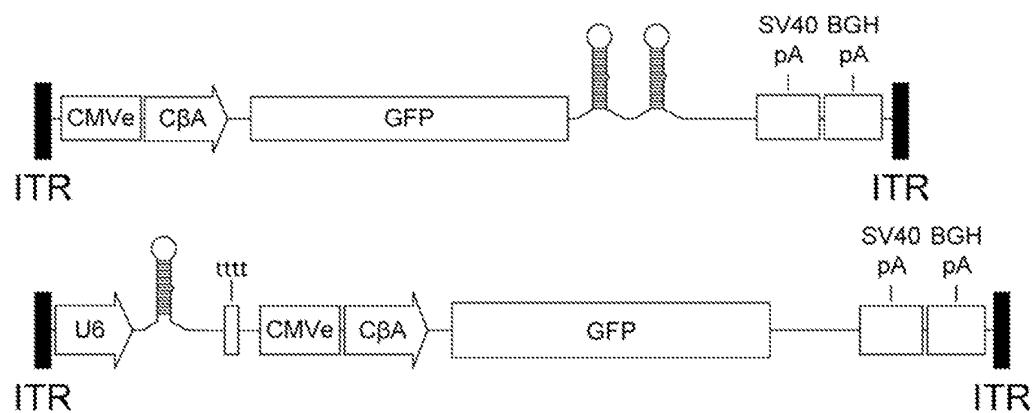


FIG. 5A

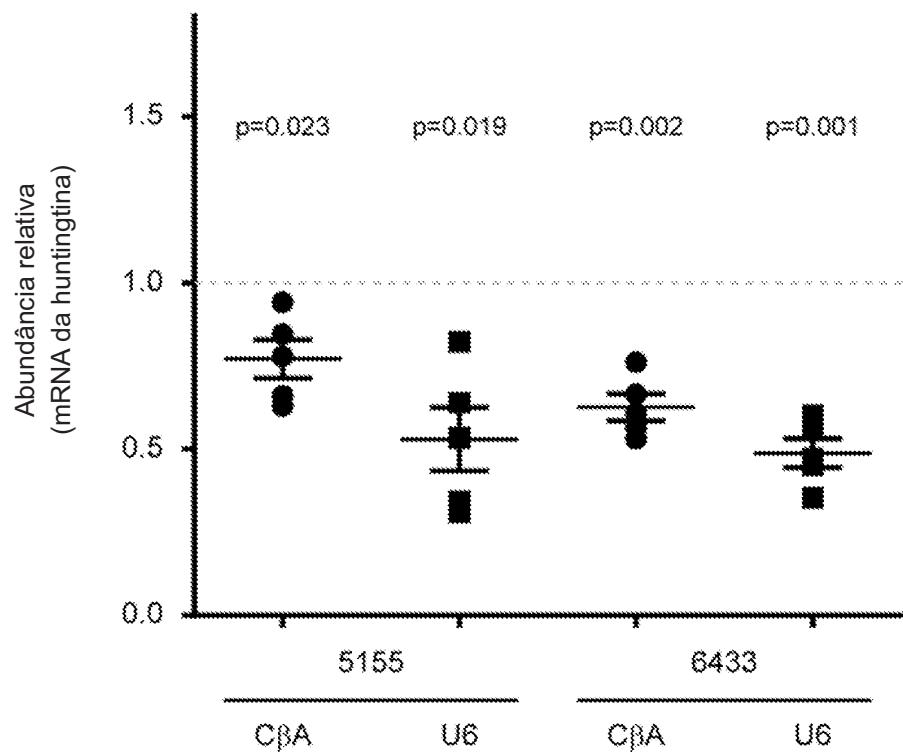


FIG. 5B

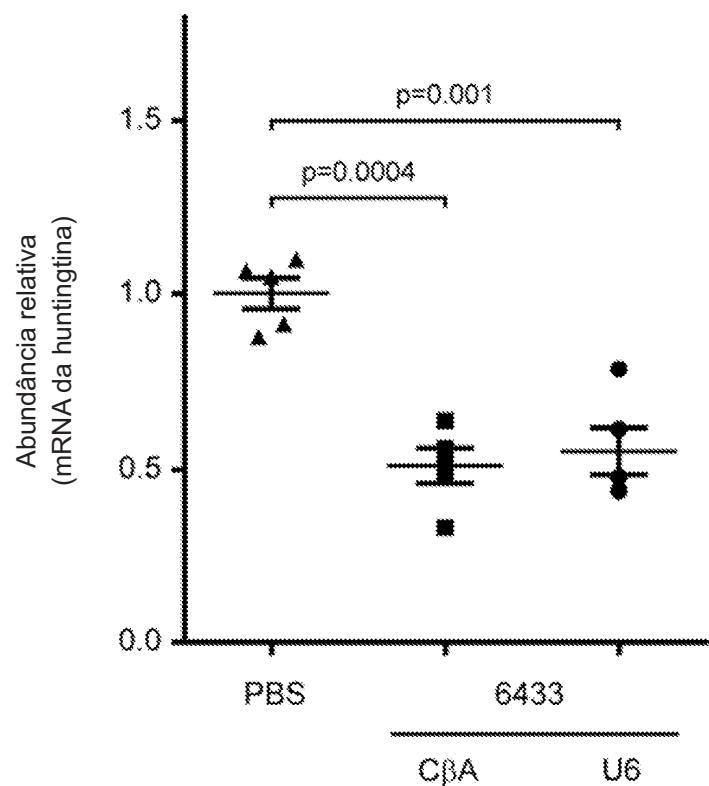


FIG. 5C

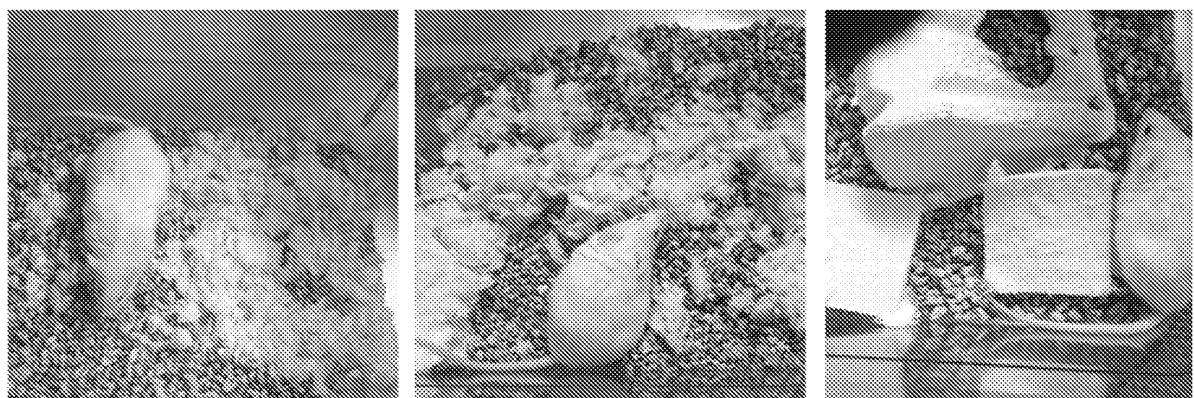


FIG. 6A

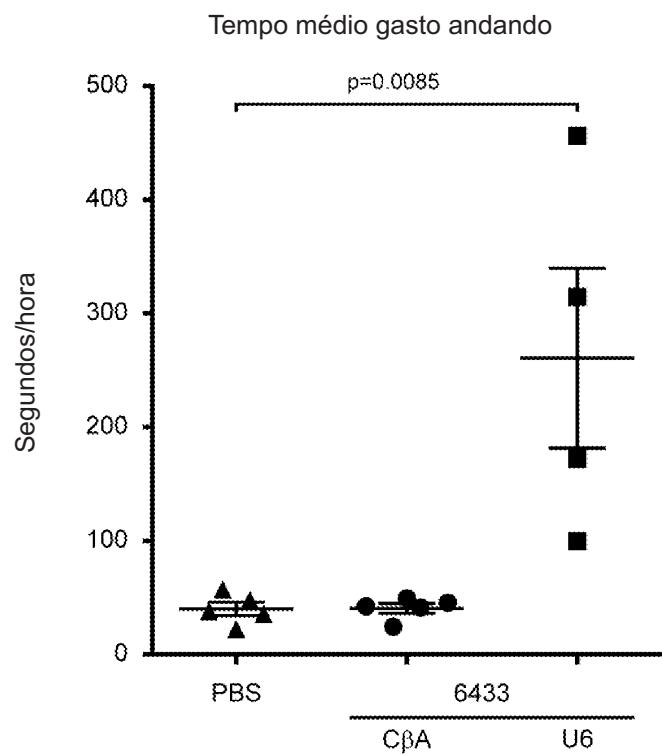


FIG. 6B

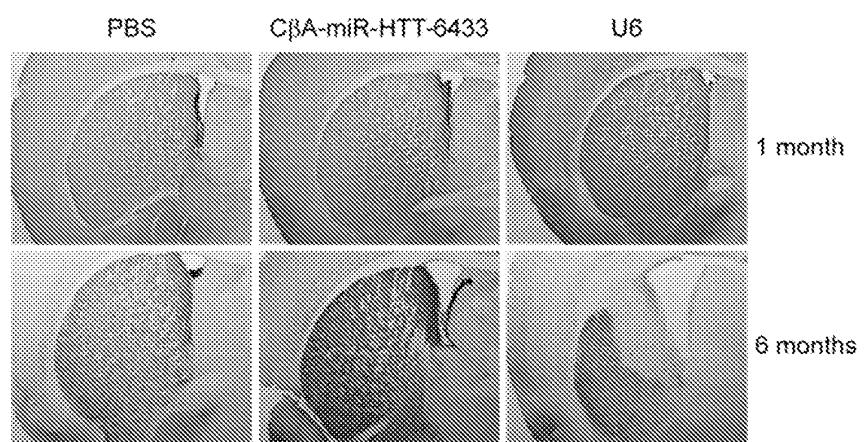


FIG. 7A

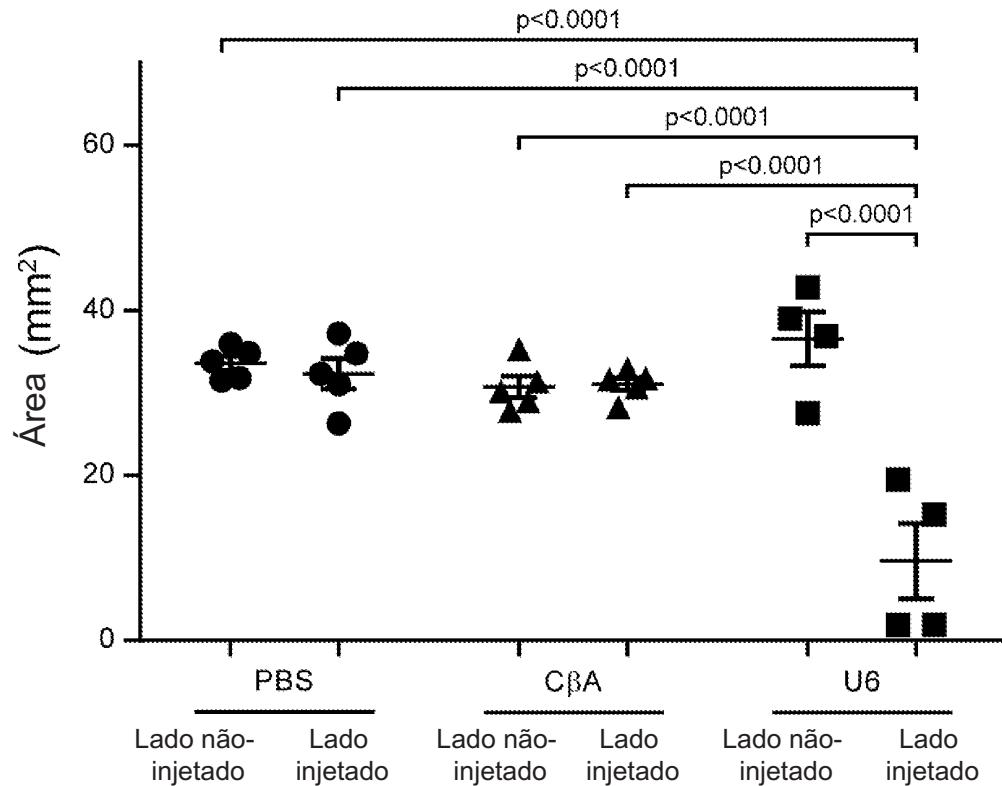


FIG. 7B

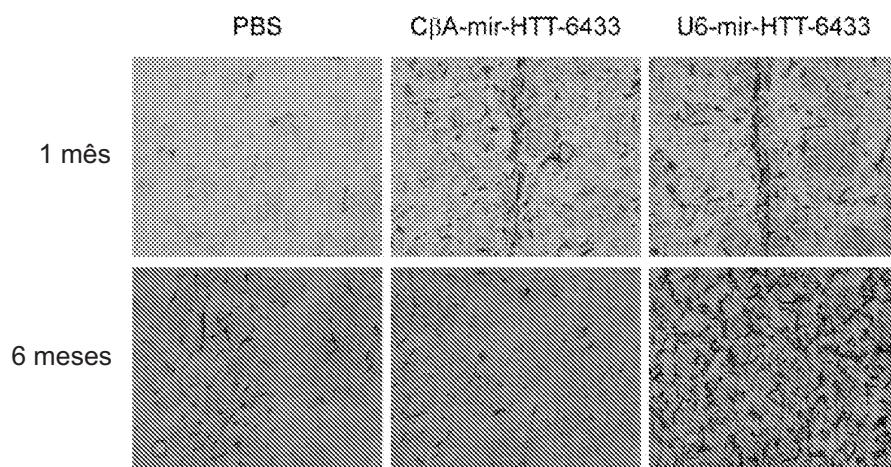


FIG. 8A

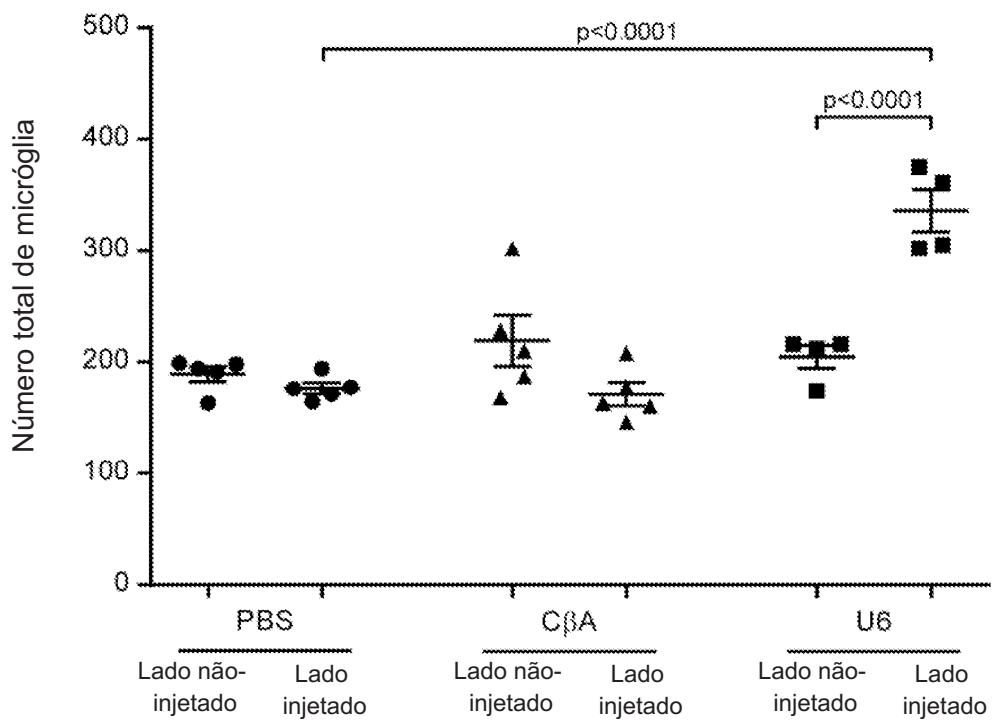


FIG. 8B

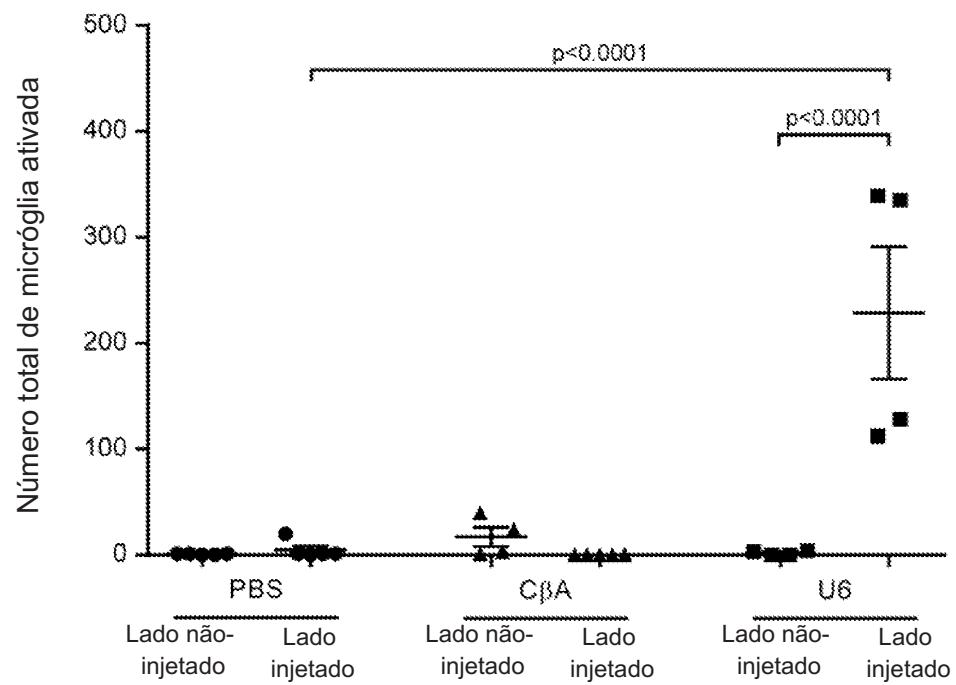


FIG. 8C

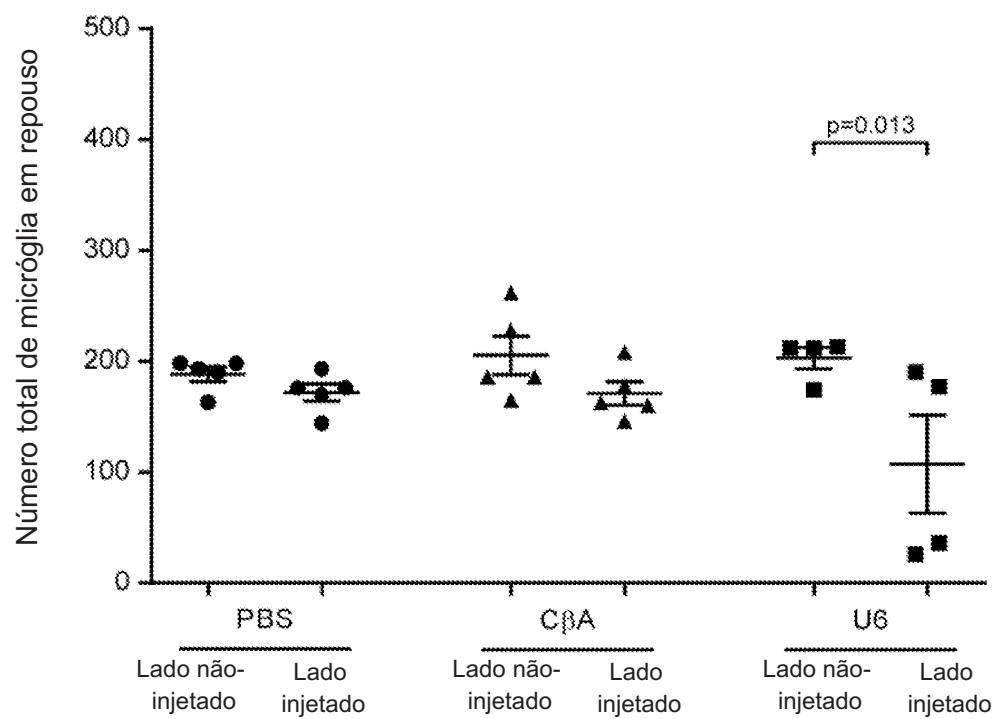


FIG. 8D

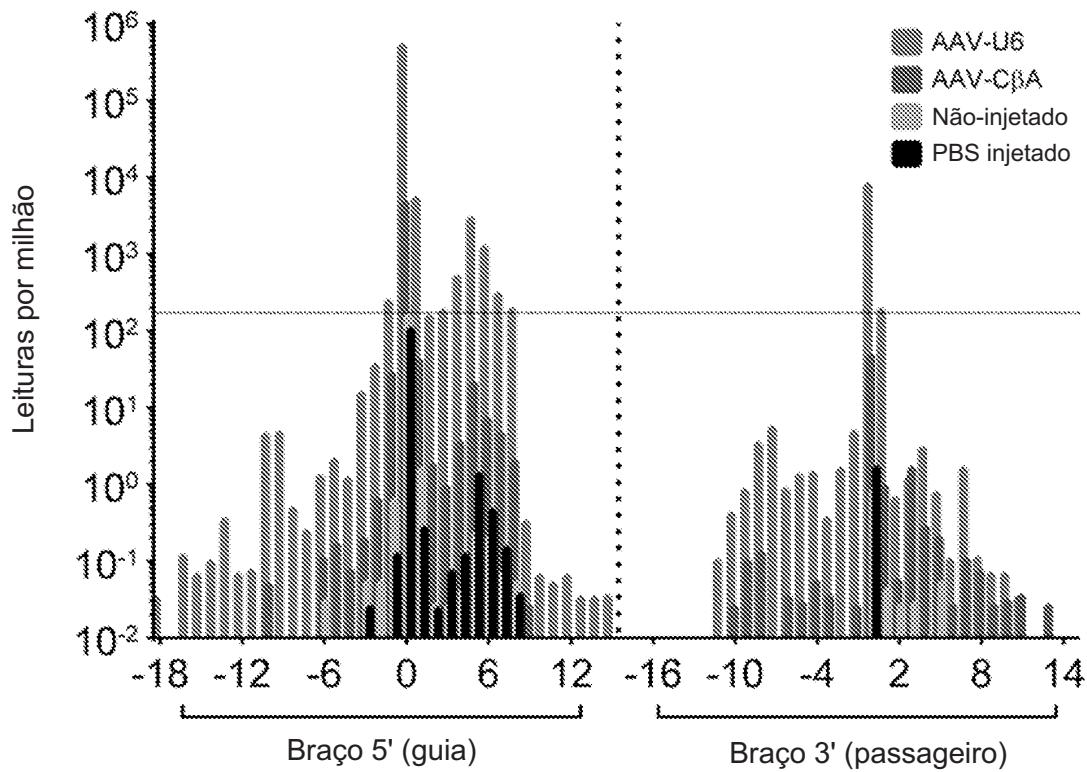


FIG. 9A

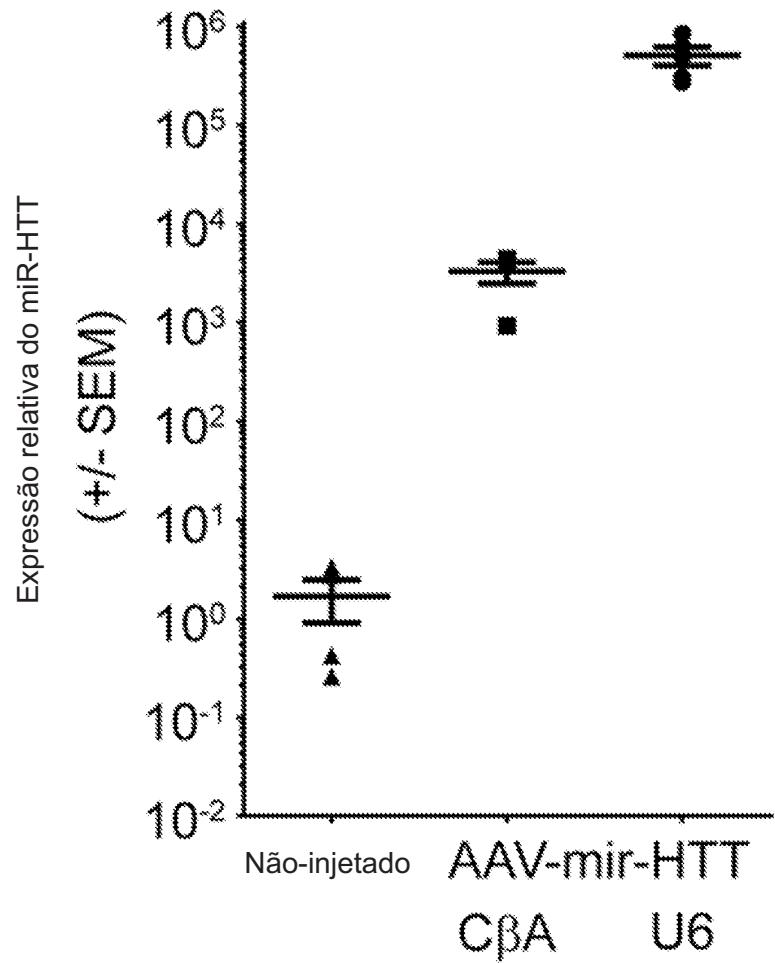


FIG. 9B

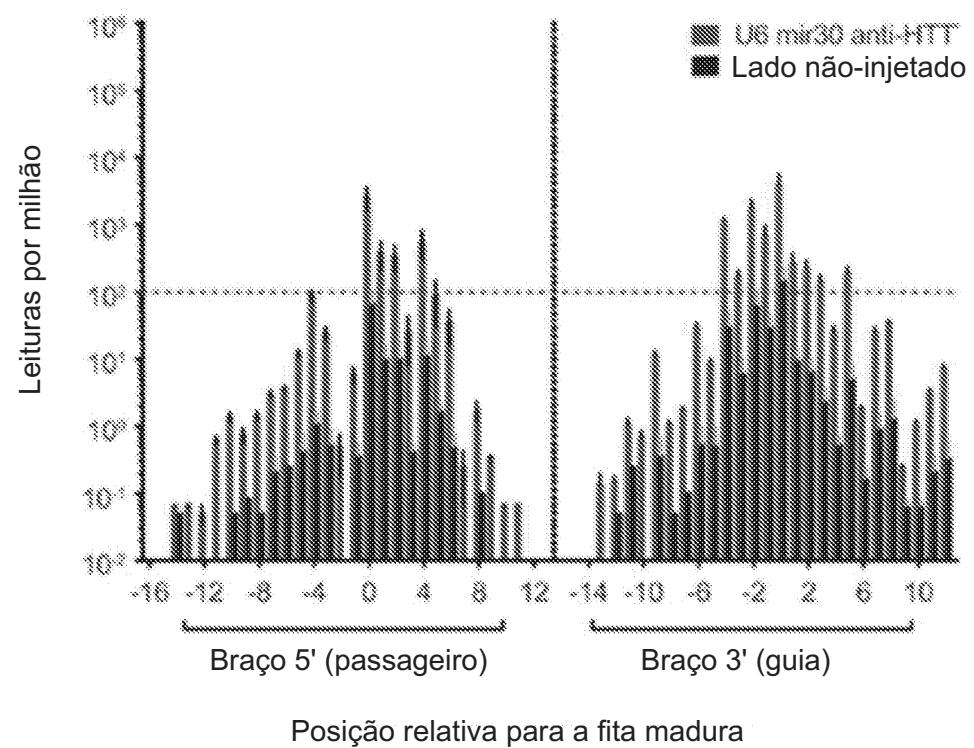


FIG. 9C

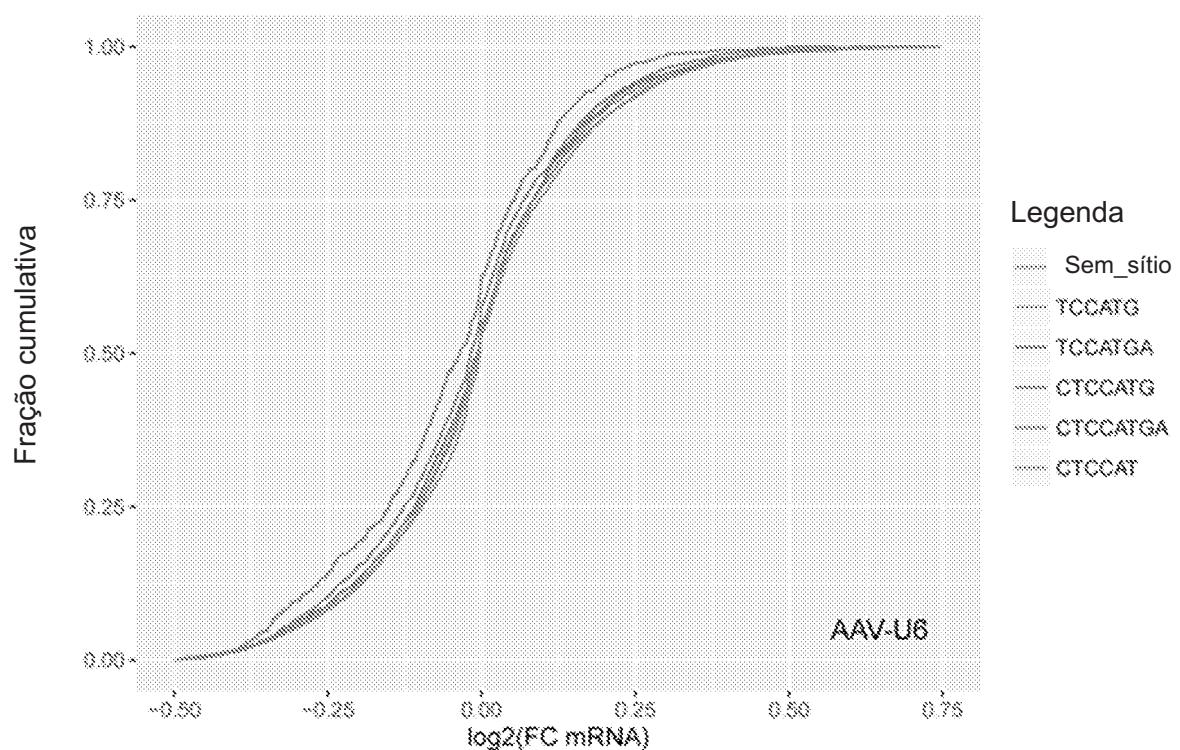


FIG. 10A

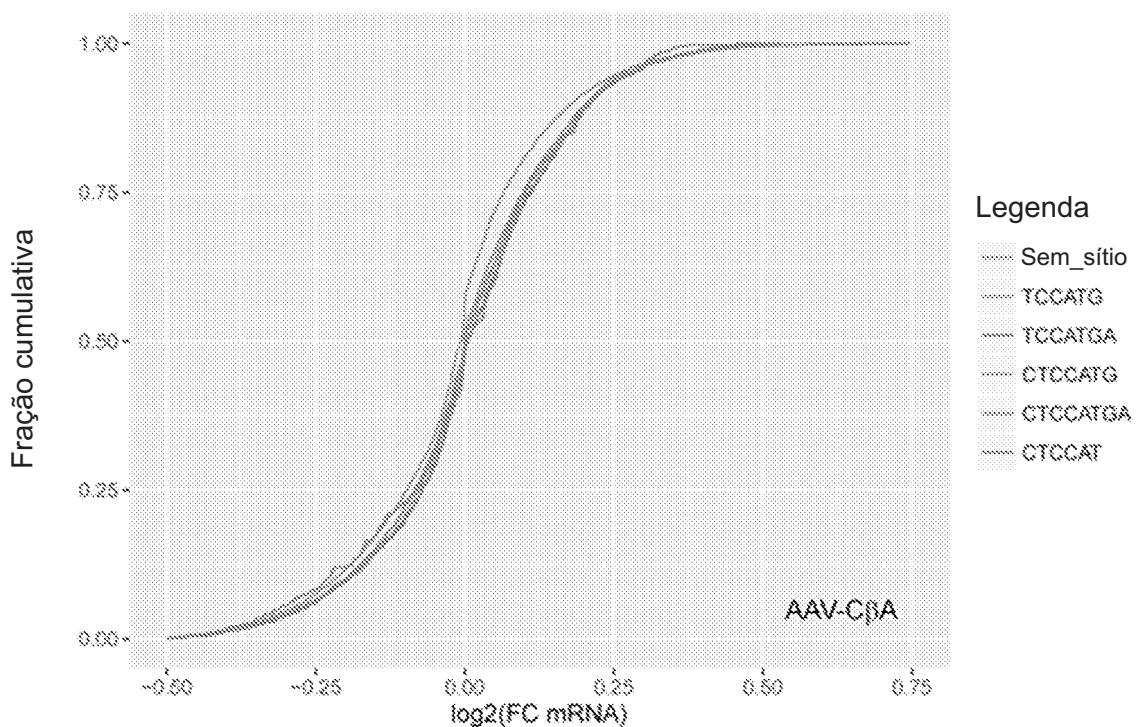


FIG. 10B

18/46

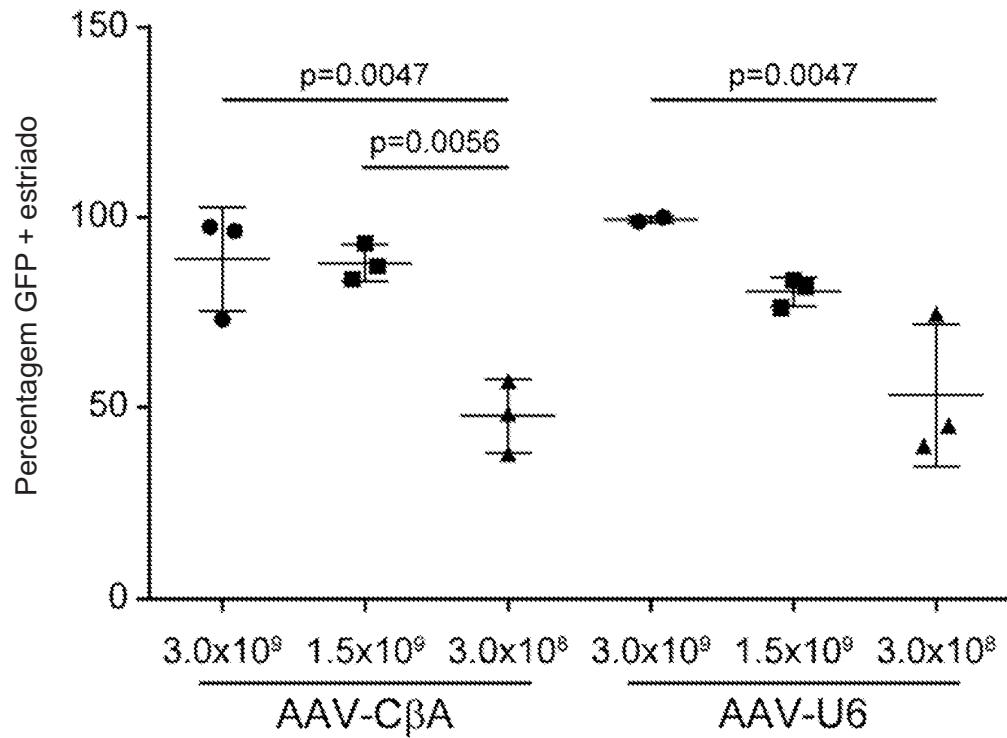


FIG. 11A

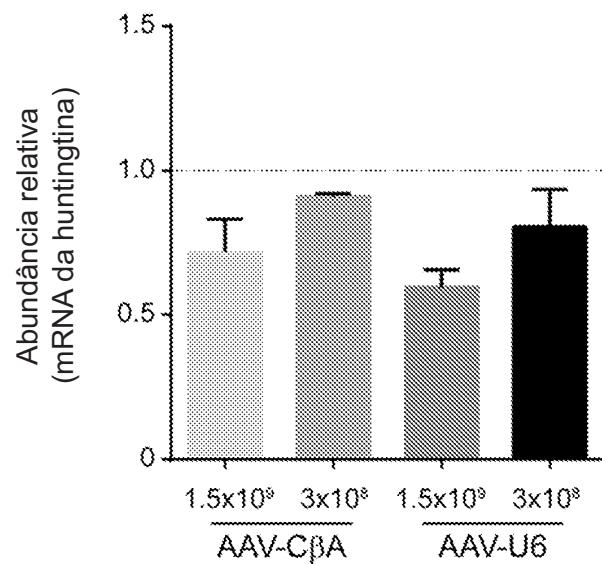


FIG. 11B

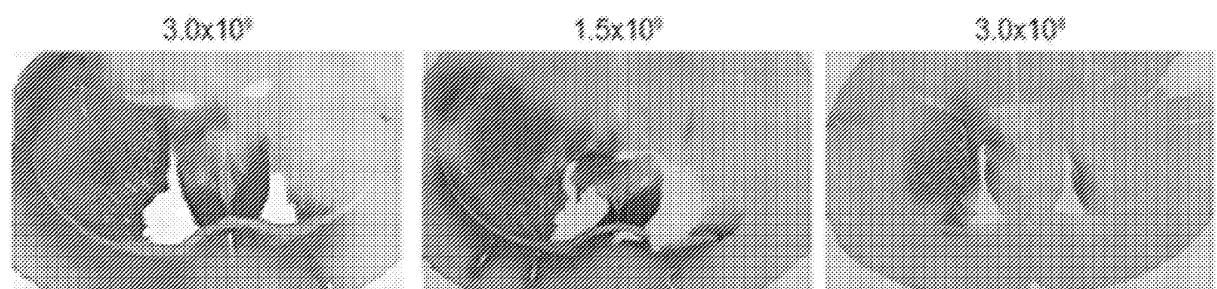


FIG. 11C

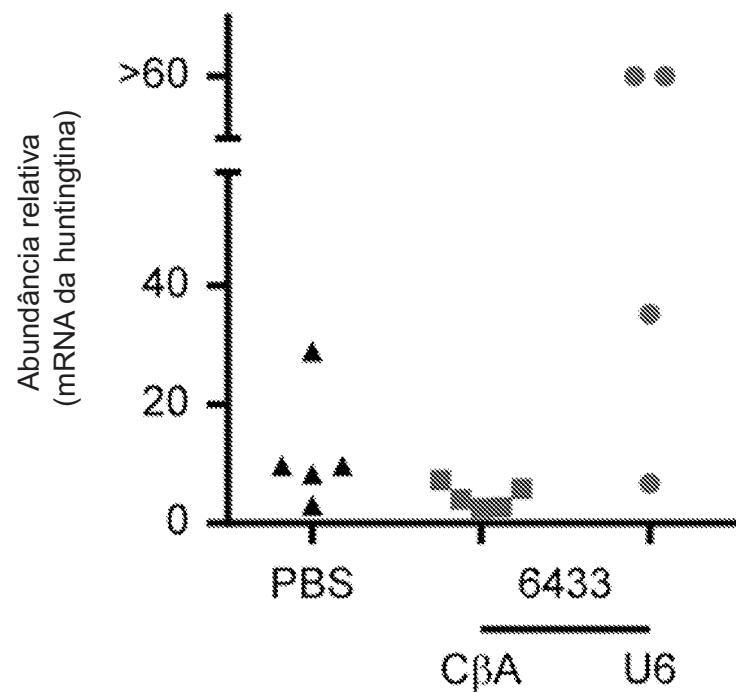


FIG. 12A

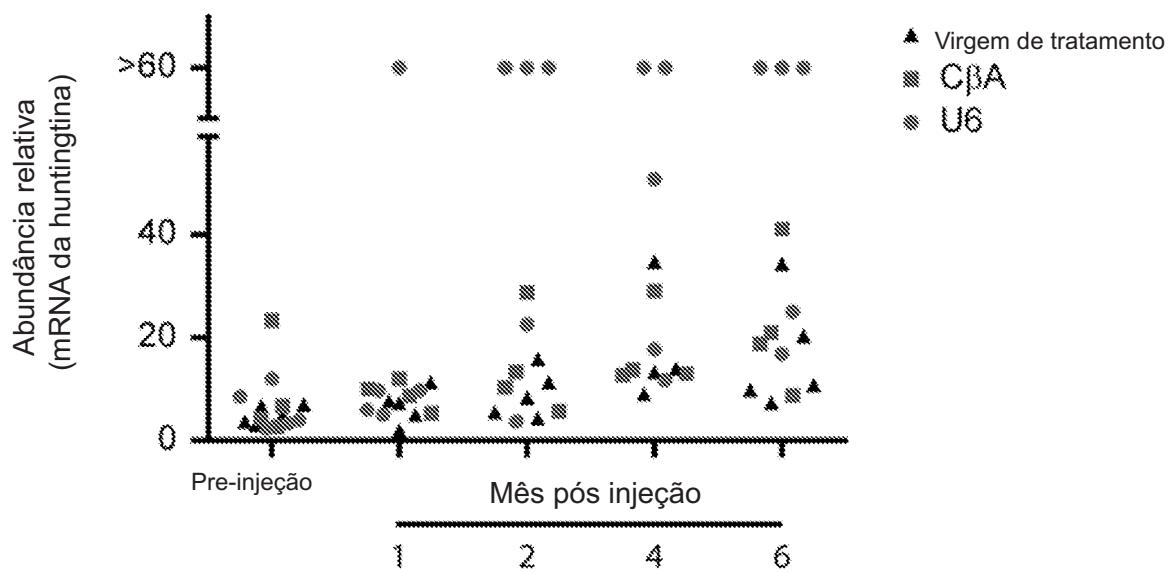


FIG. 12B

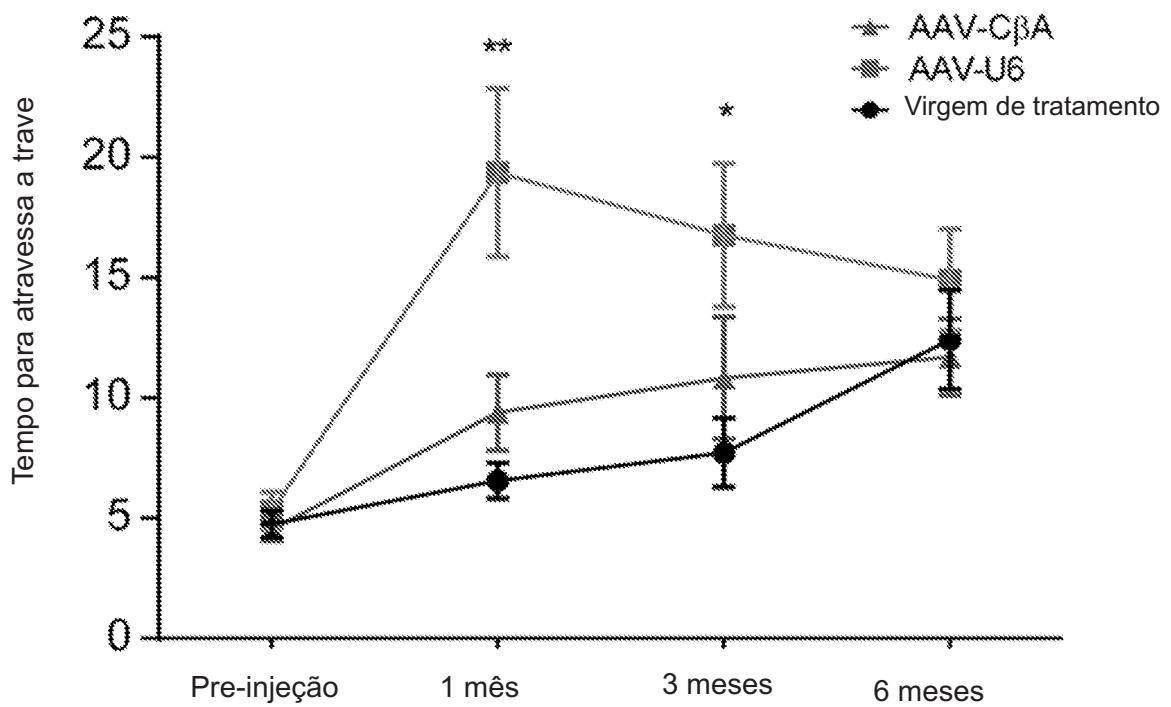


FIG. 13A

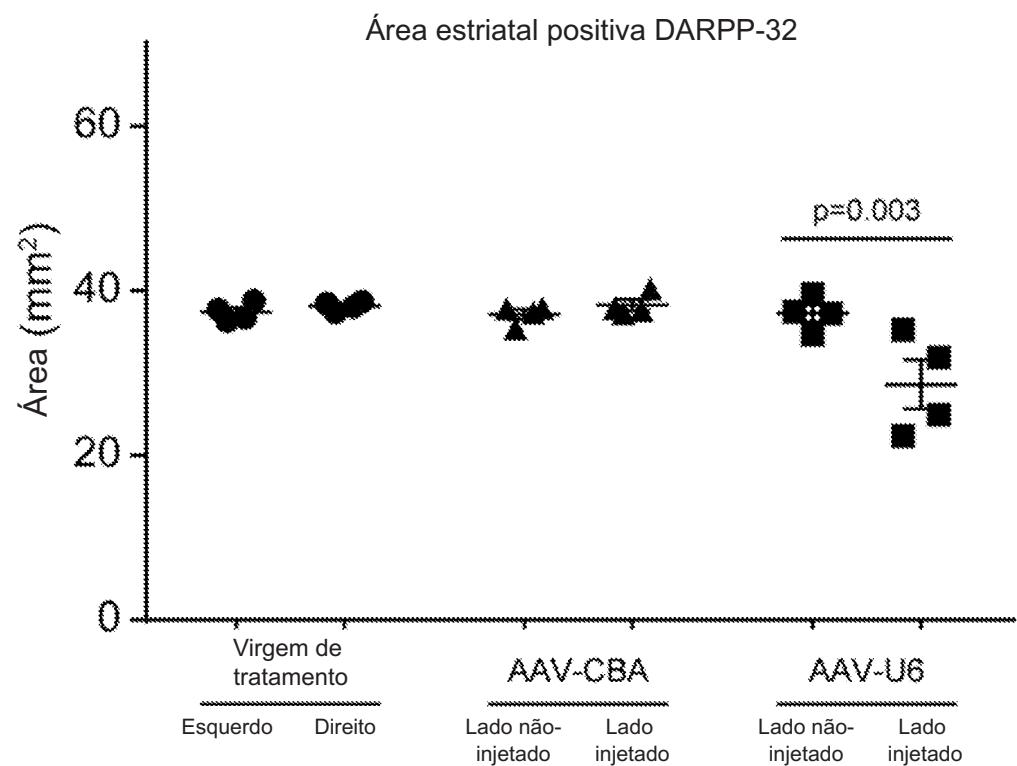


FIG. 13B

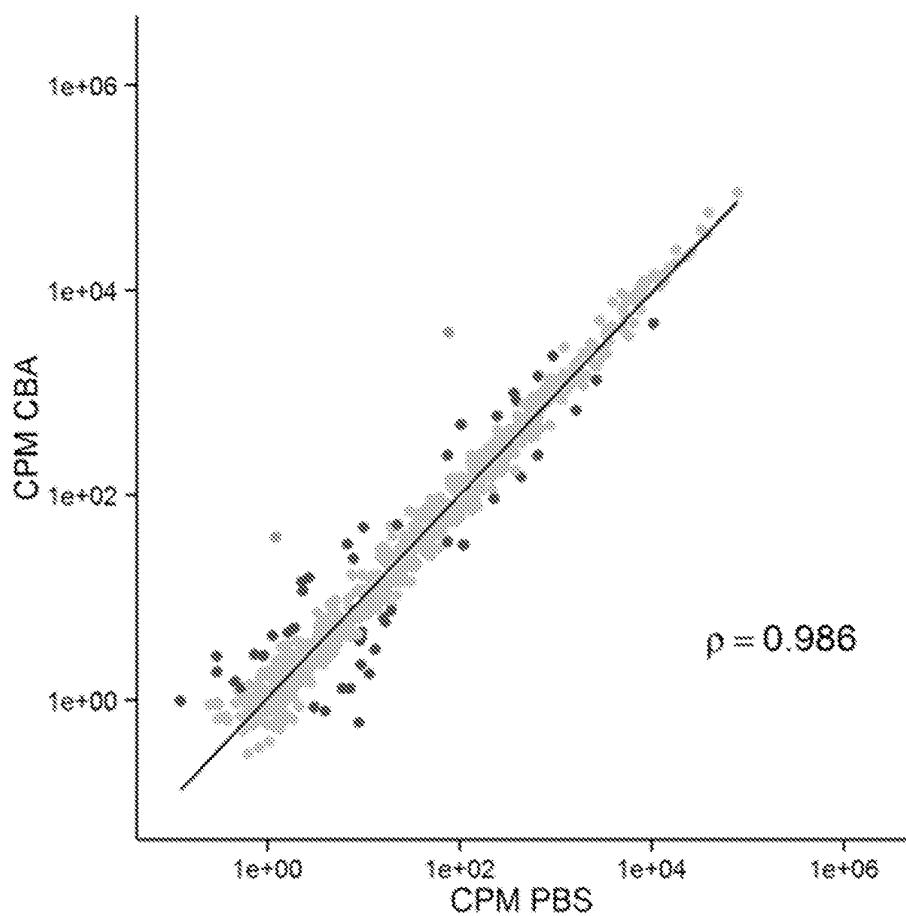


FIG. 14A

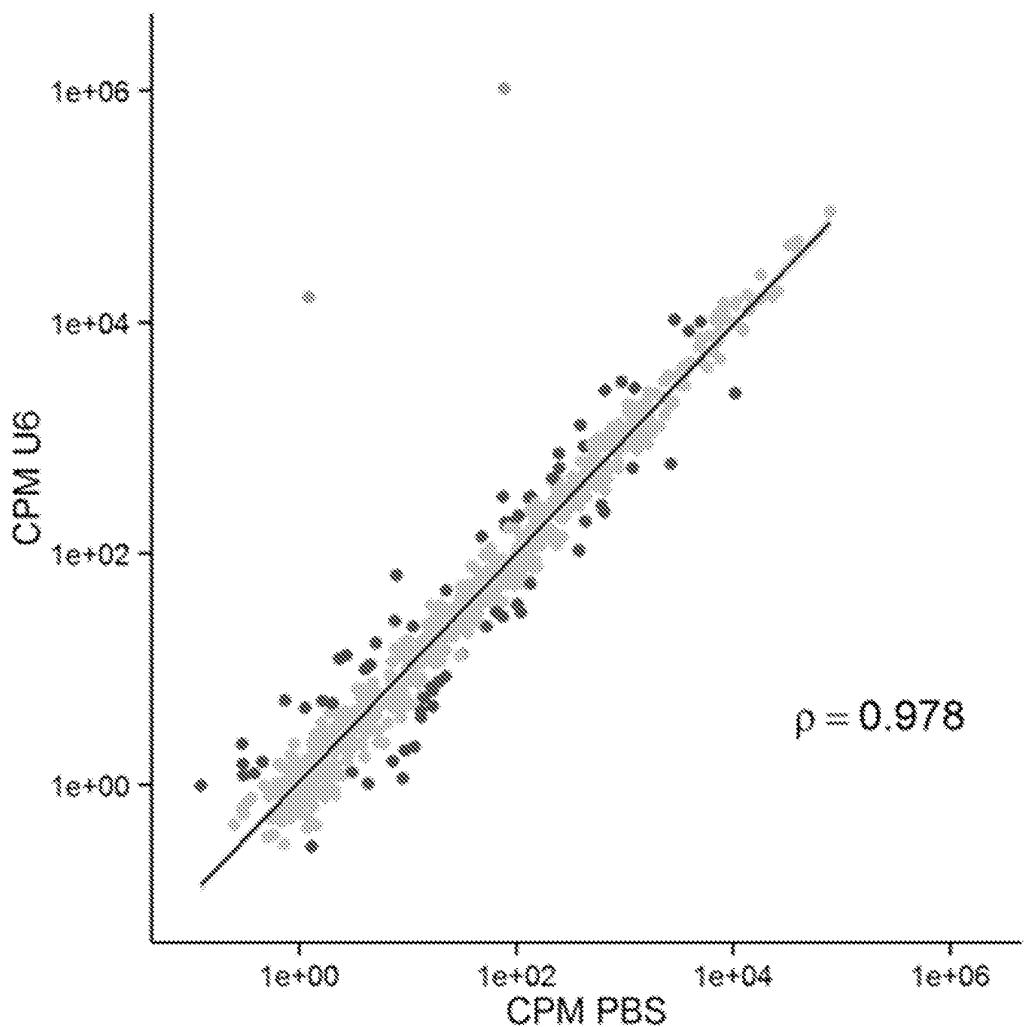


FIG. 14B

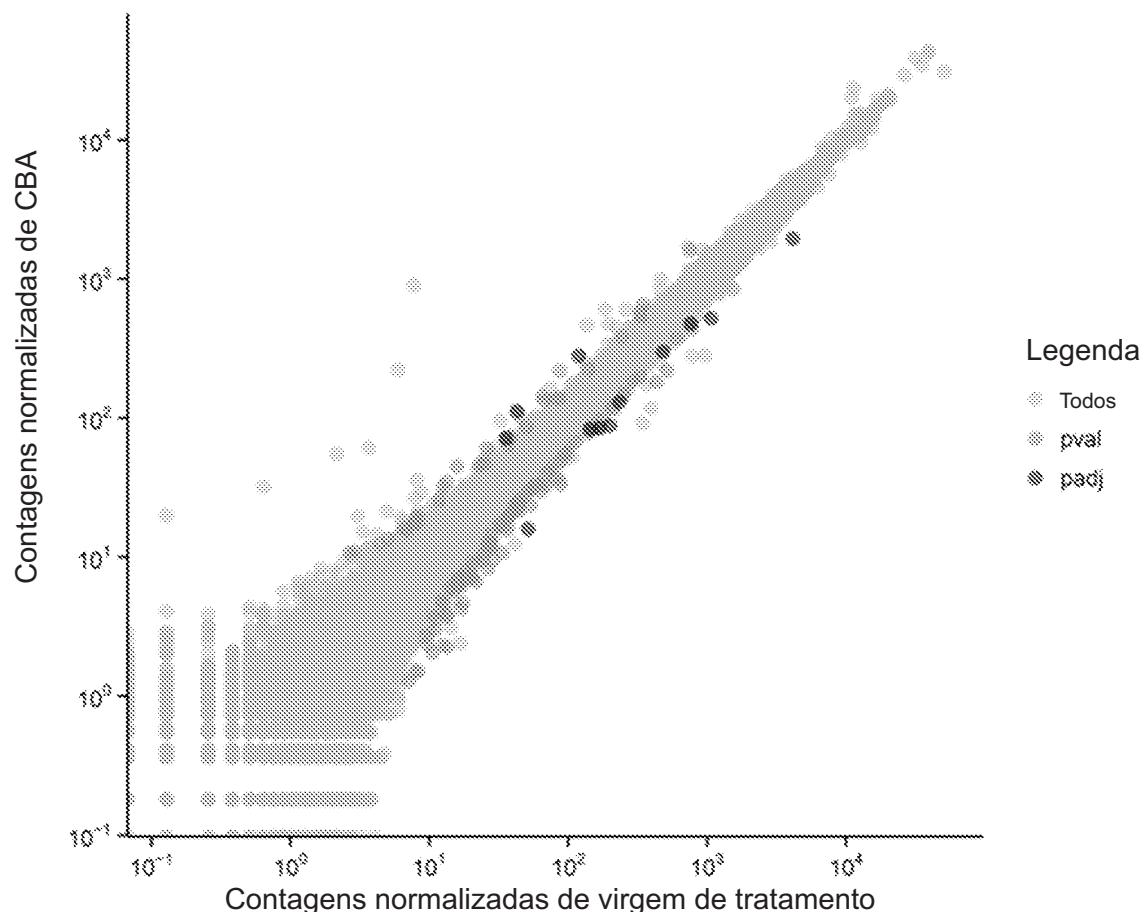


FIG. 15A

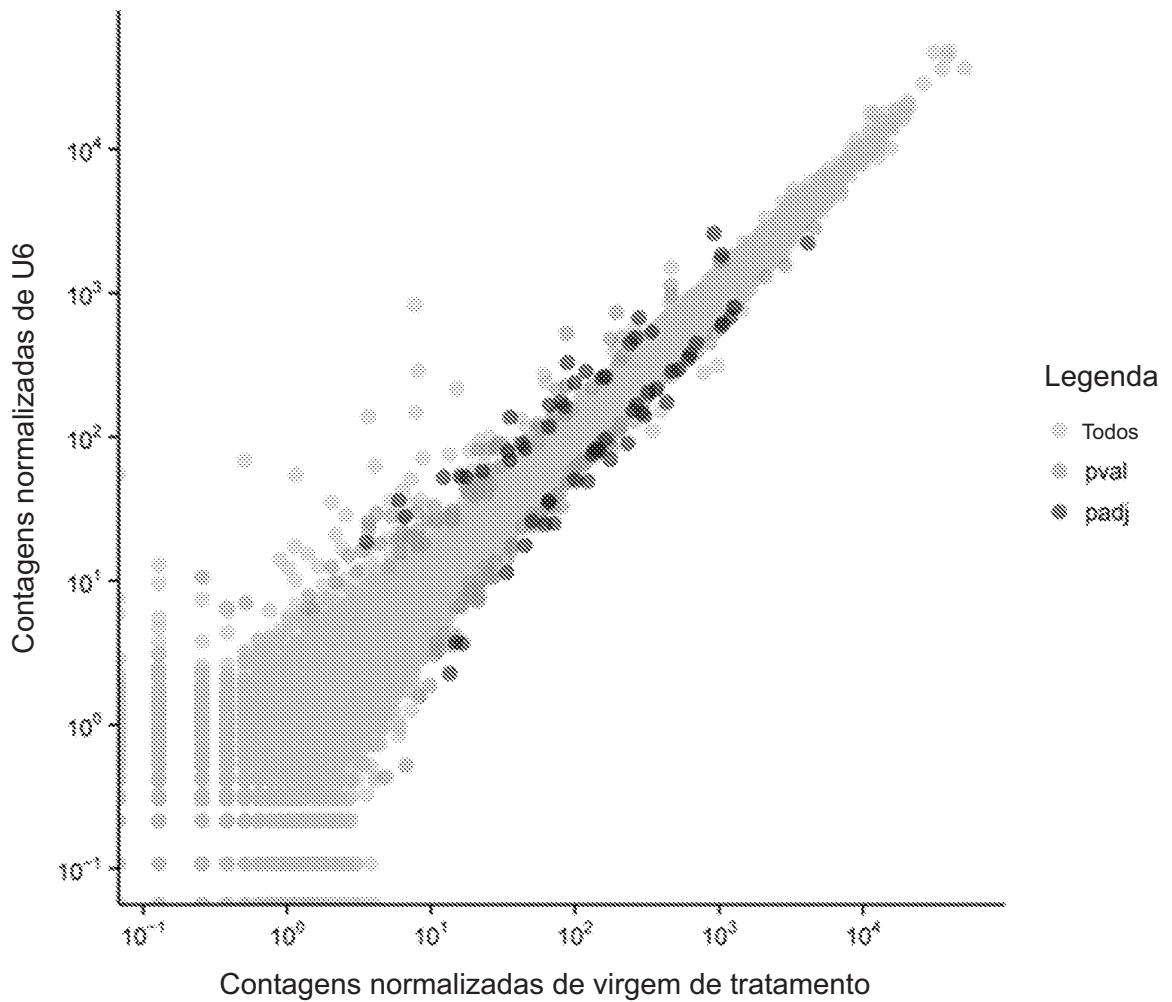


FIG. 15B

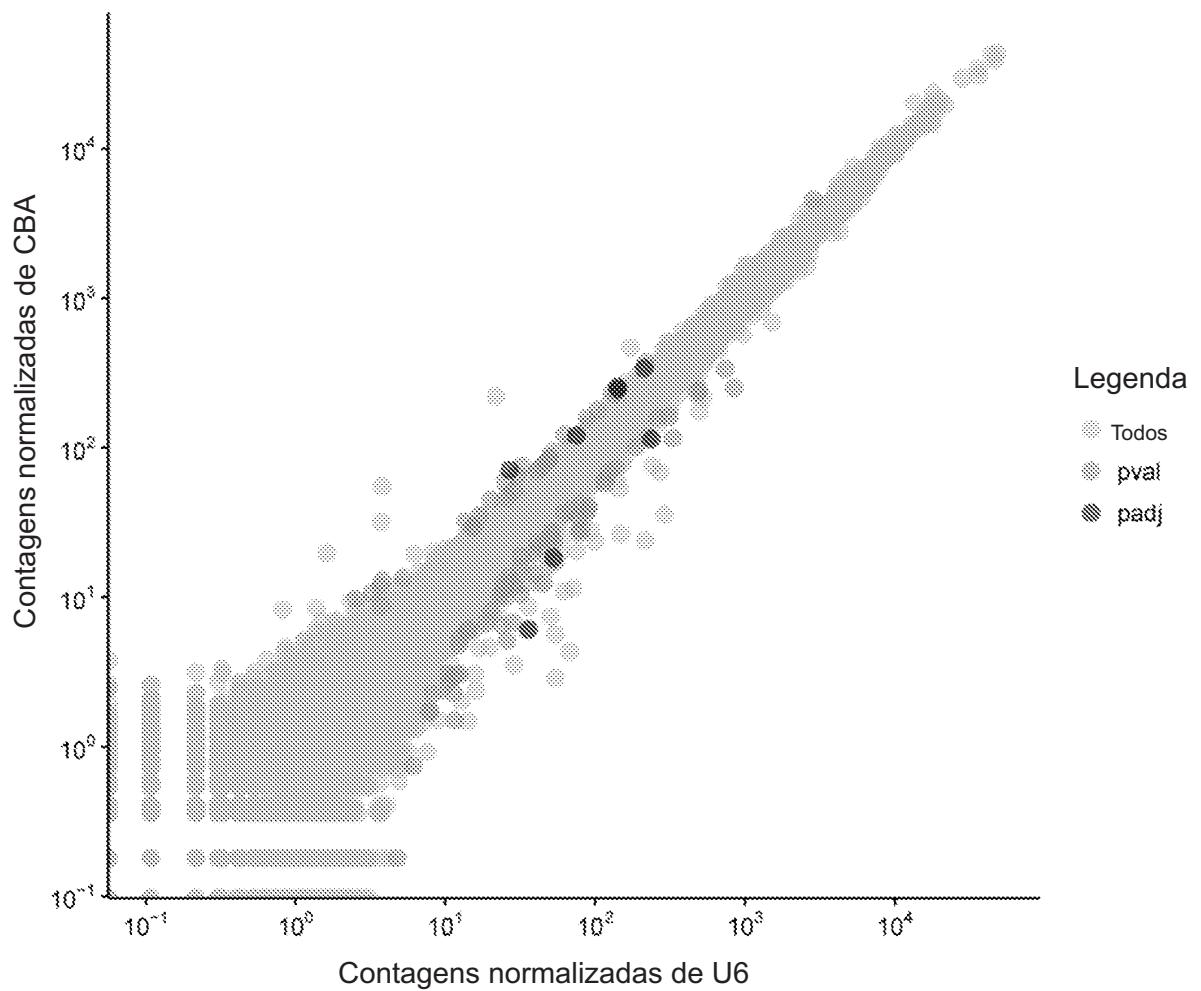


FIG. 15C

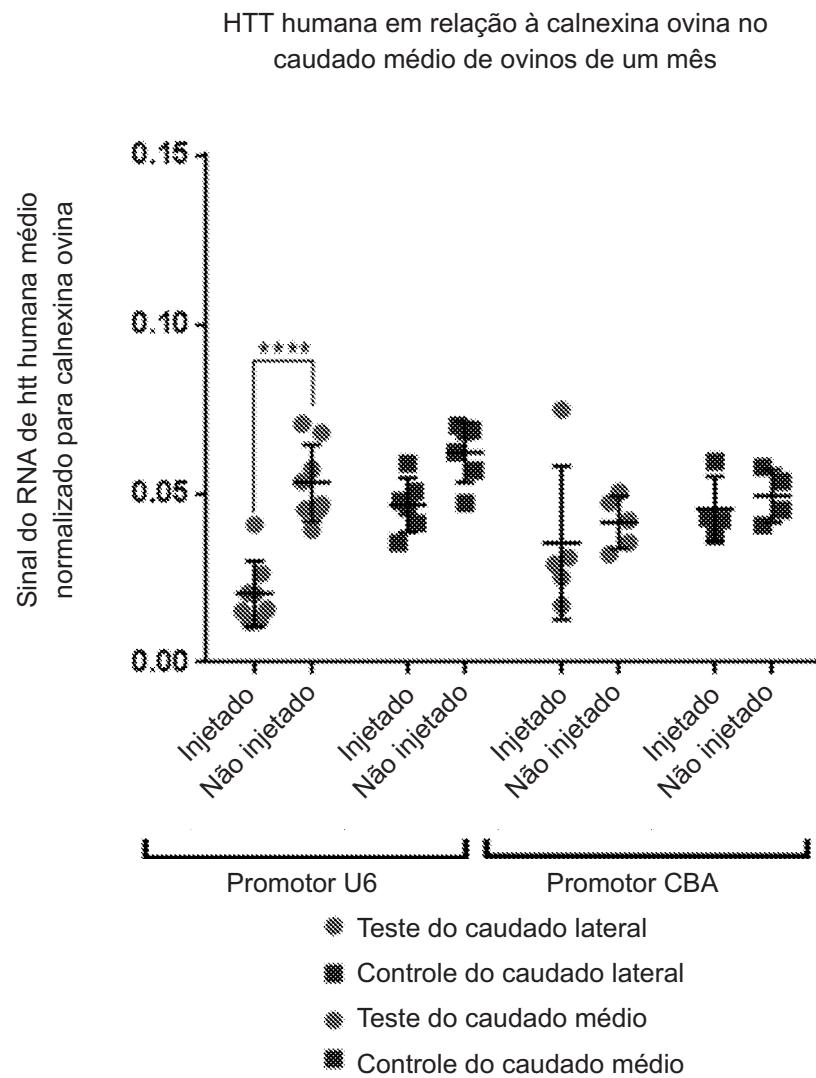


FIG. 16

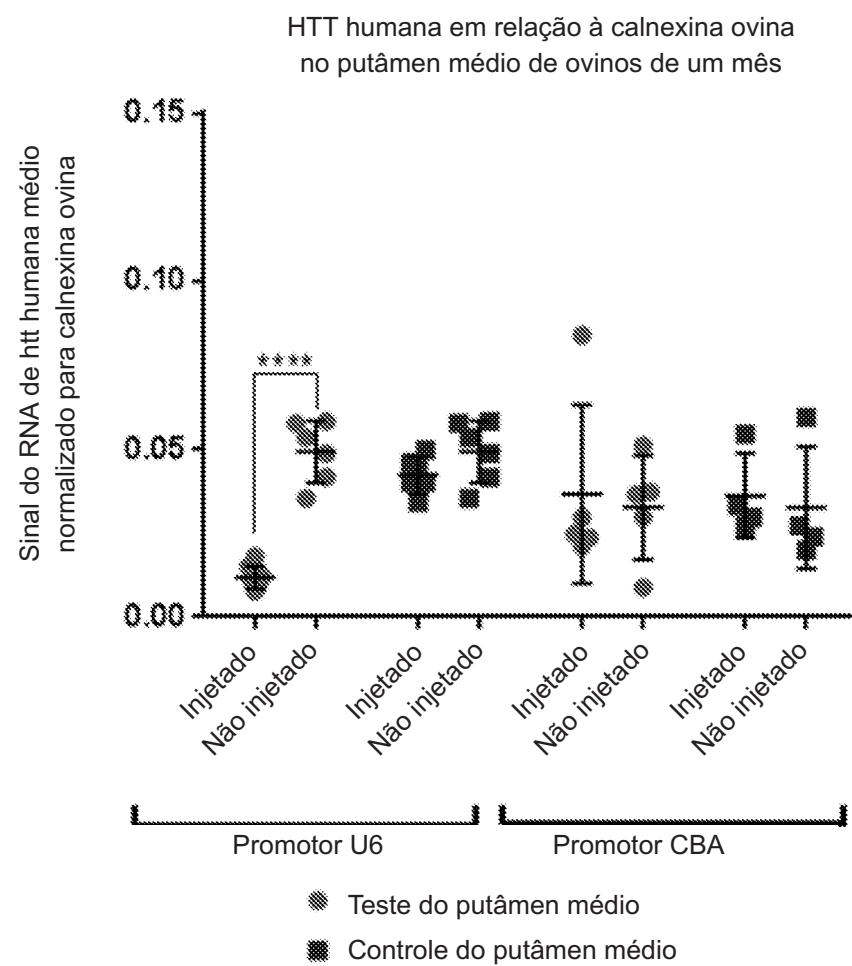


FIG. 17

HTT humana em relação à calnexina ovina no
lado medial do caudado médio
(ovinos de seis meses, promotor CBA)

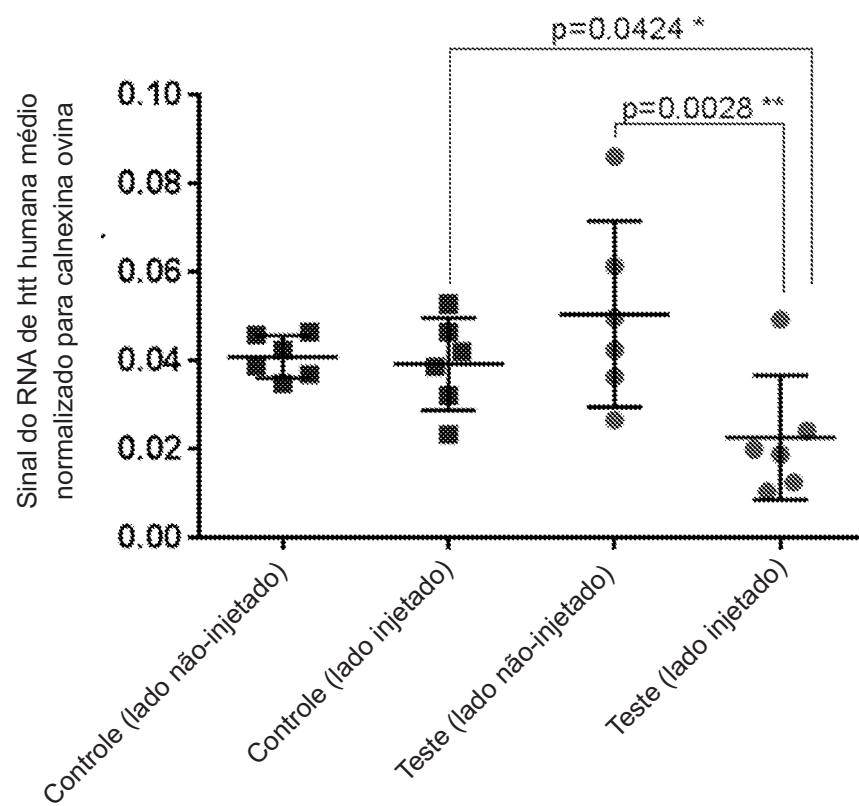


FIG. 18

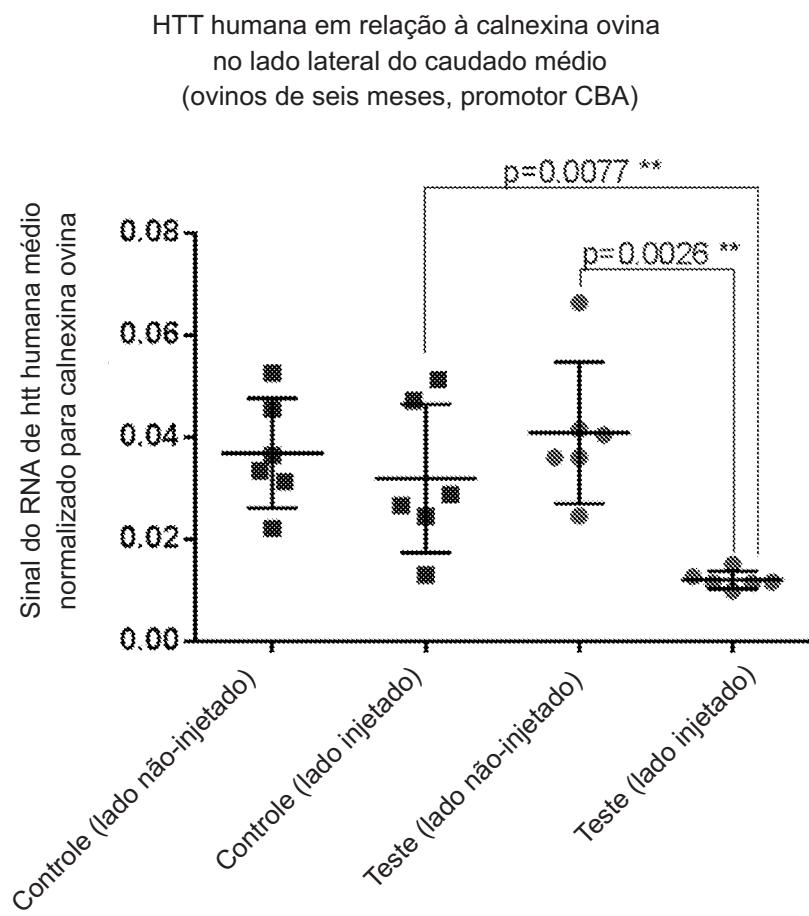


FIG. 19

HTT humana em relação à calnexina ovina no caudado
médio de ovinos de seis meses, promotor U6 vs. CBA

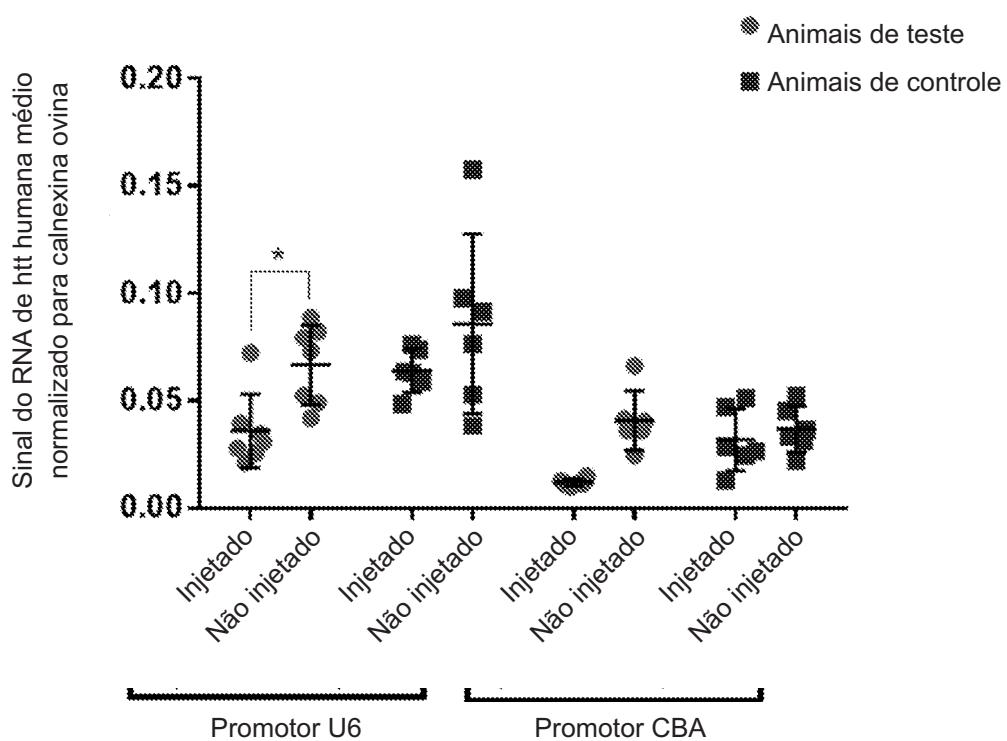


FIG. 20

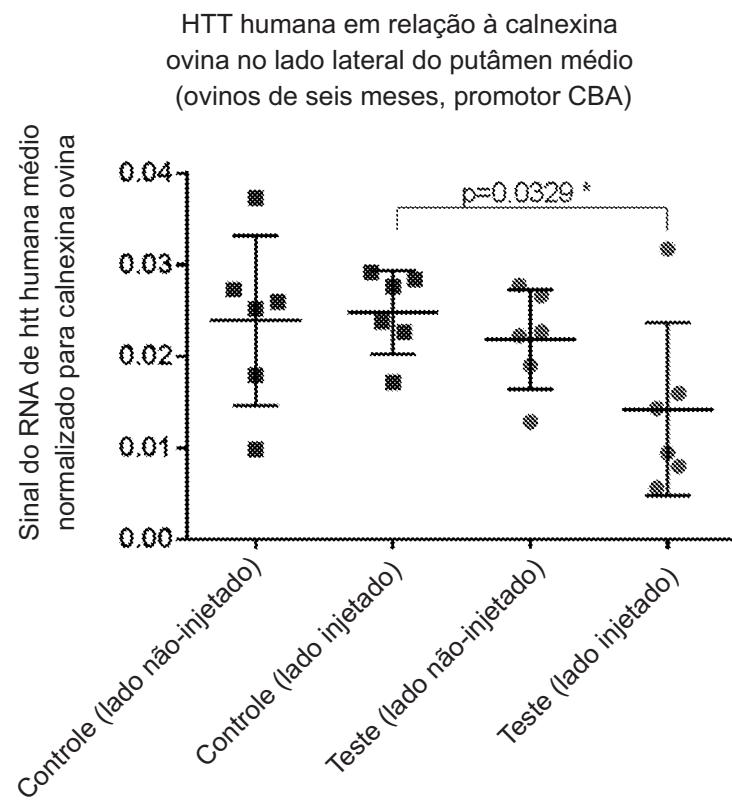


FIG. 21

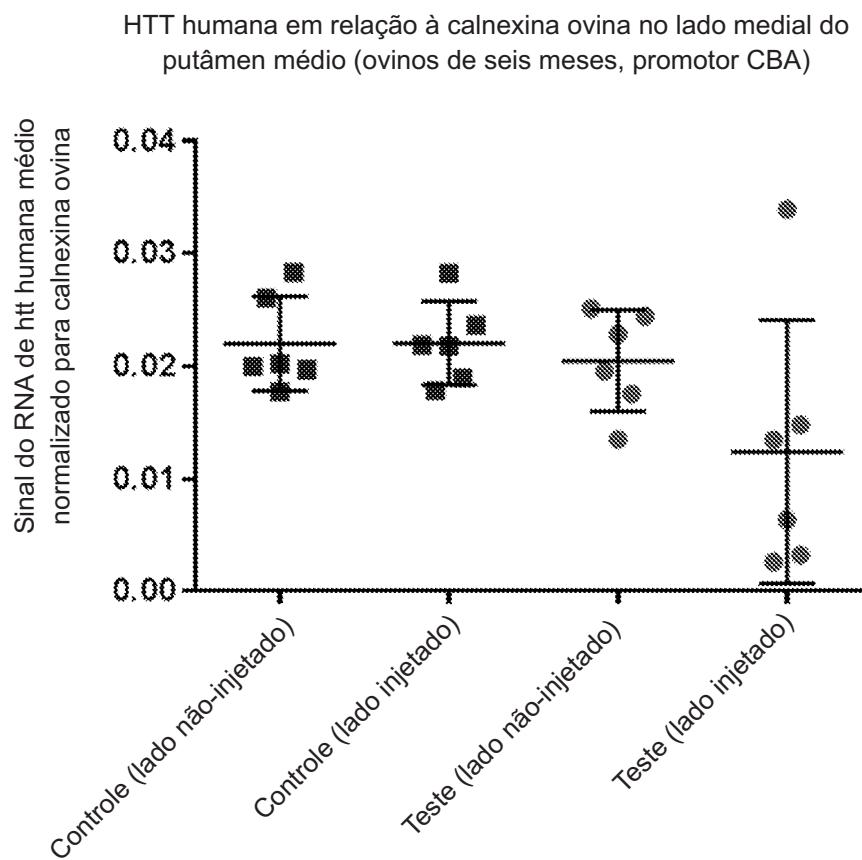


FIG. 22

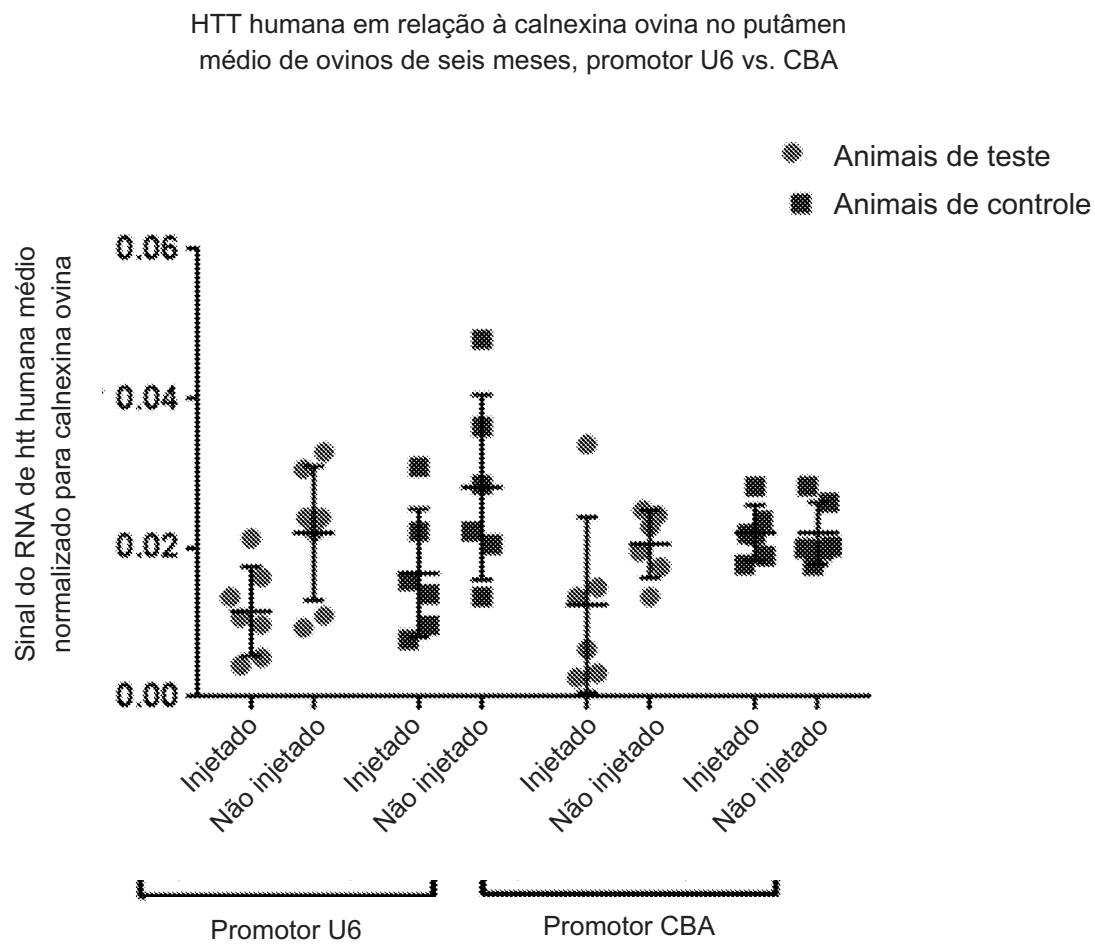


FIG. 23

HTT humana em relação à calnexina ovina no estriado anterior de ovinos de seis meses, promotor U6 vs. CBA

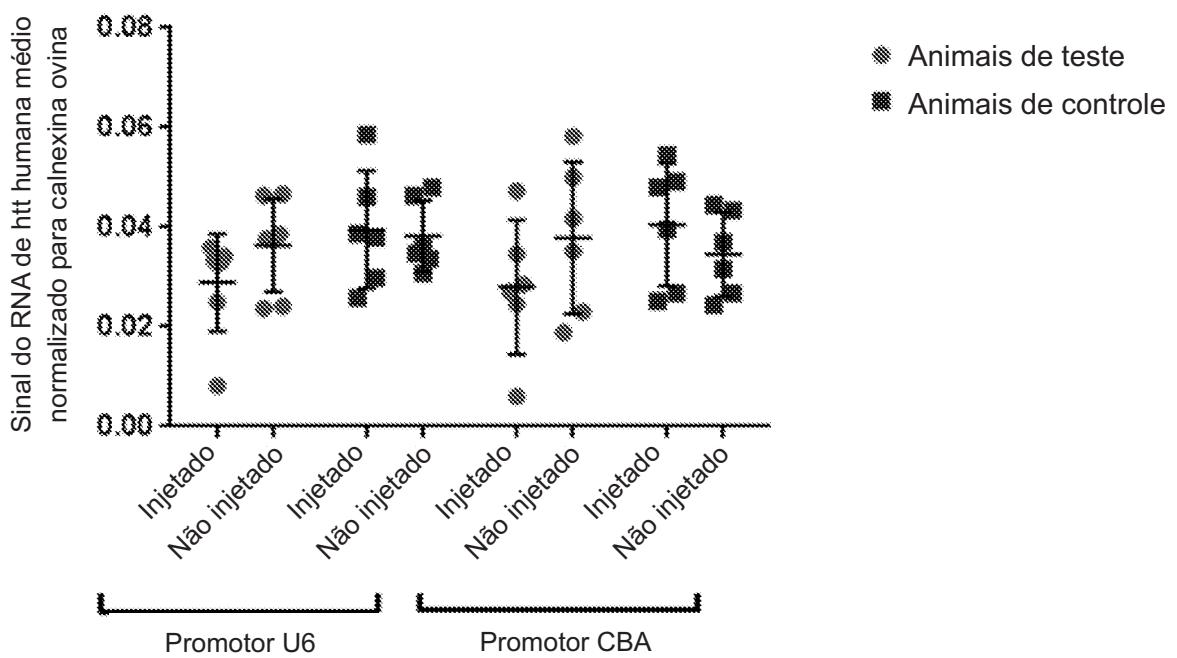


FIG. 24

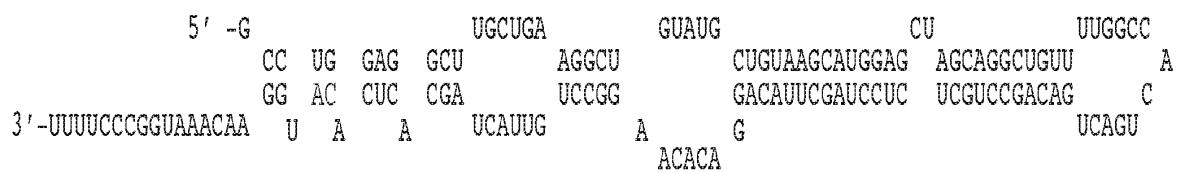


FIG. 25A

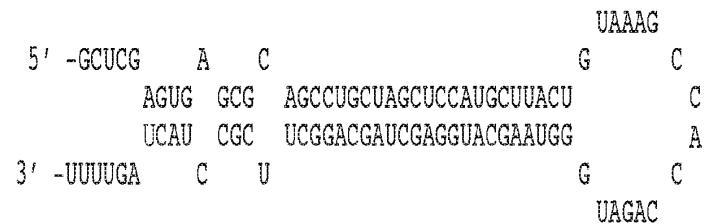


FIG. 25B

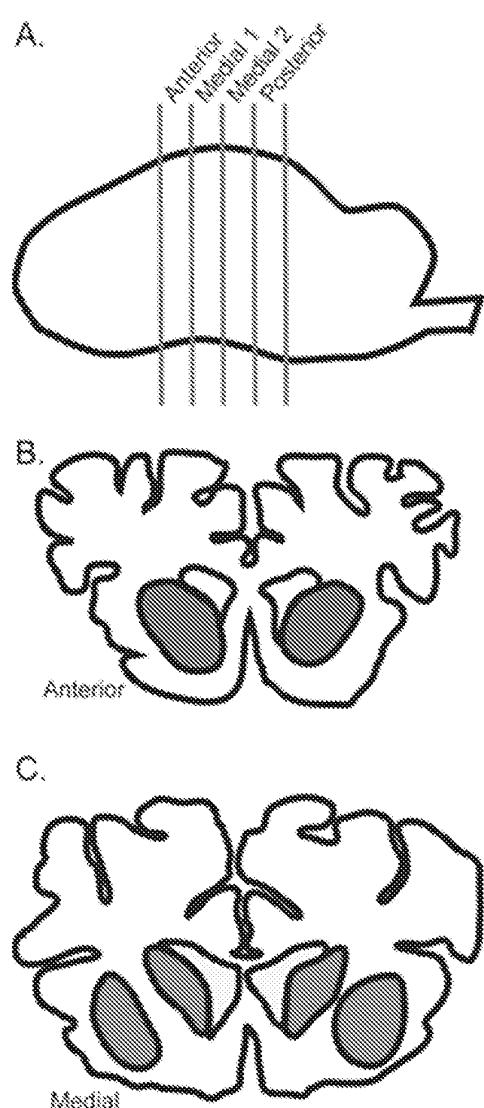


FIG. 26A

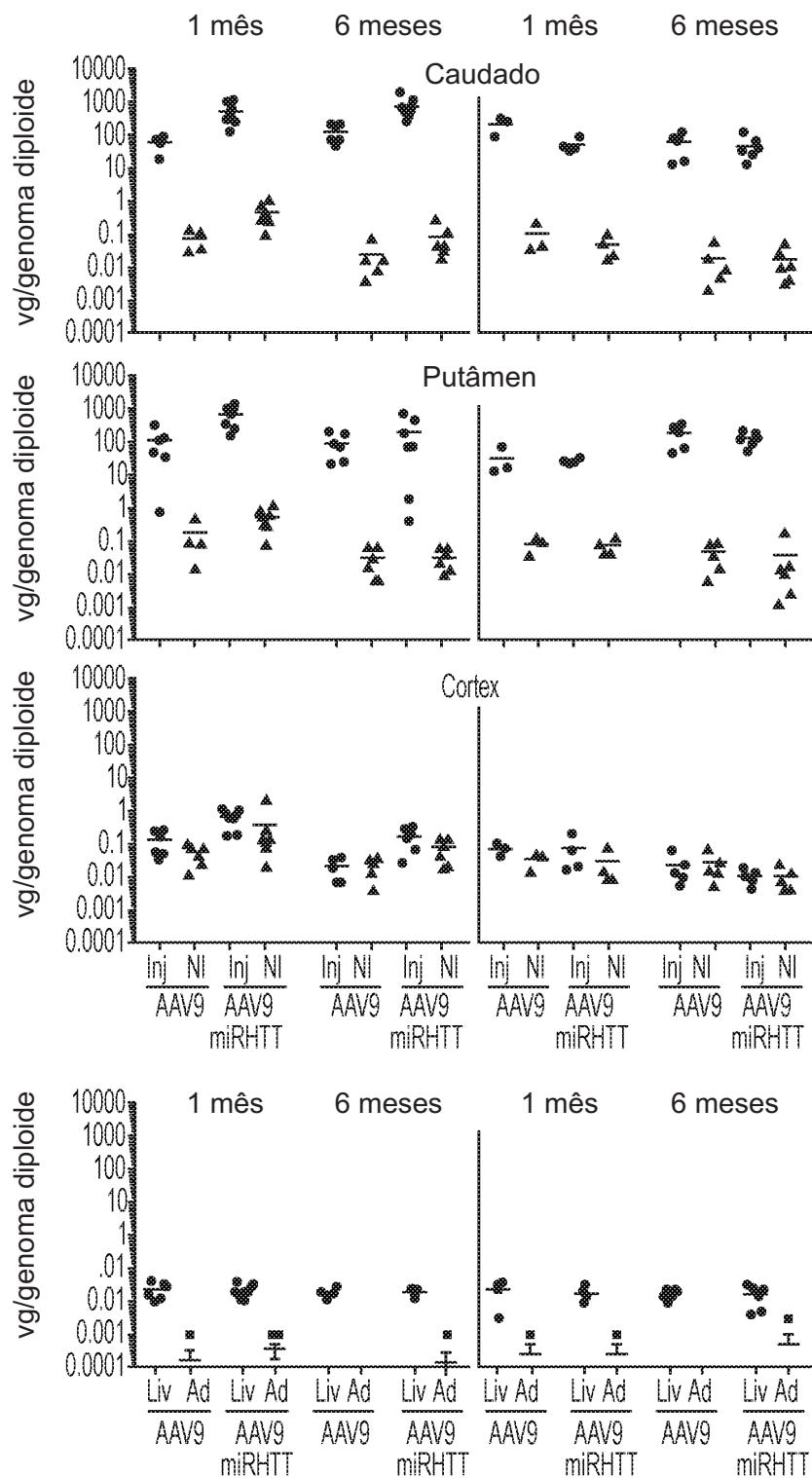


FIG. 26B

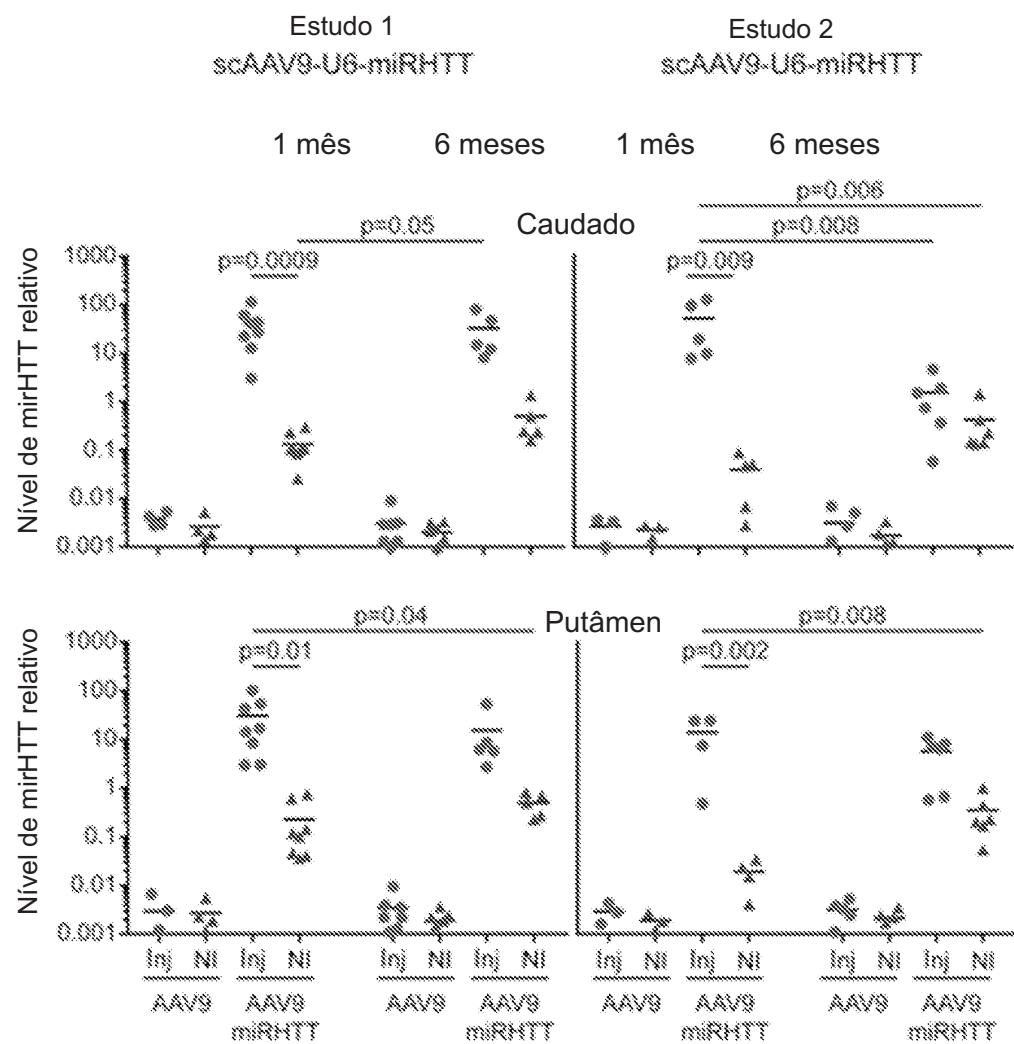


FIG. 27

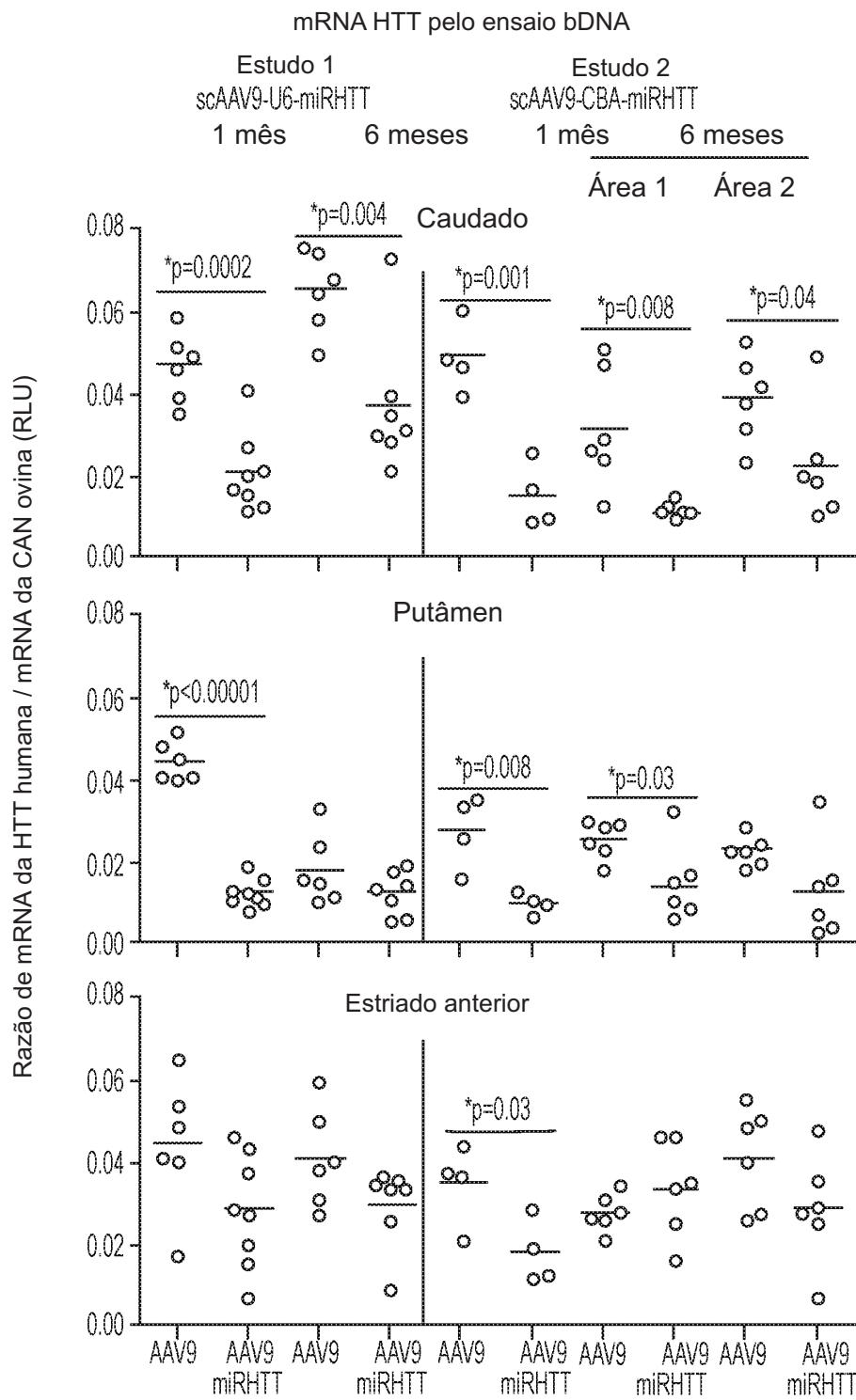


FIG. 28

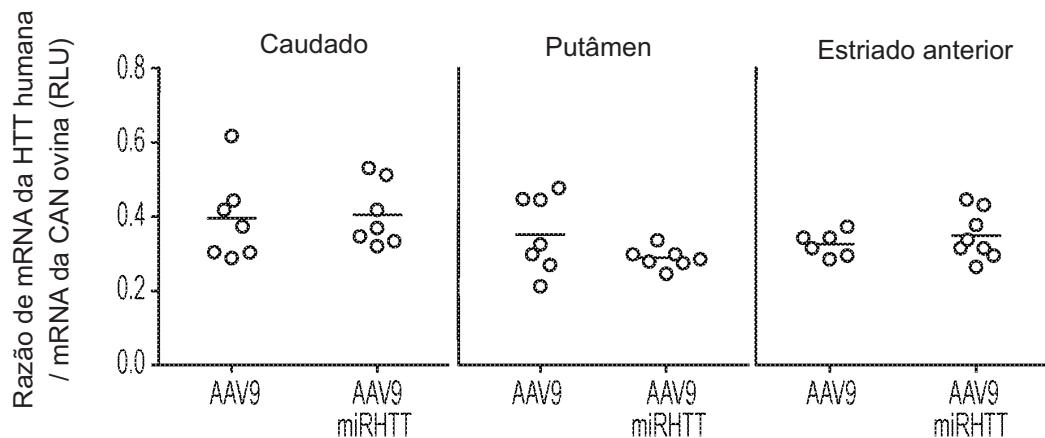


FIG. 29A

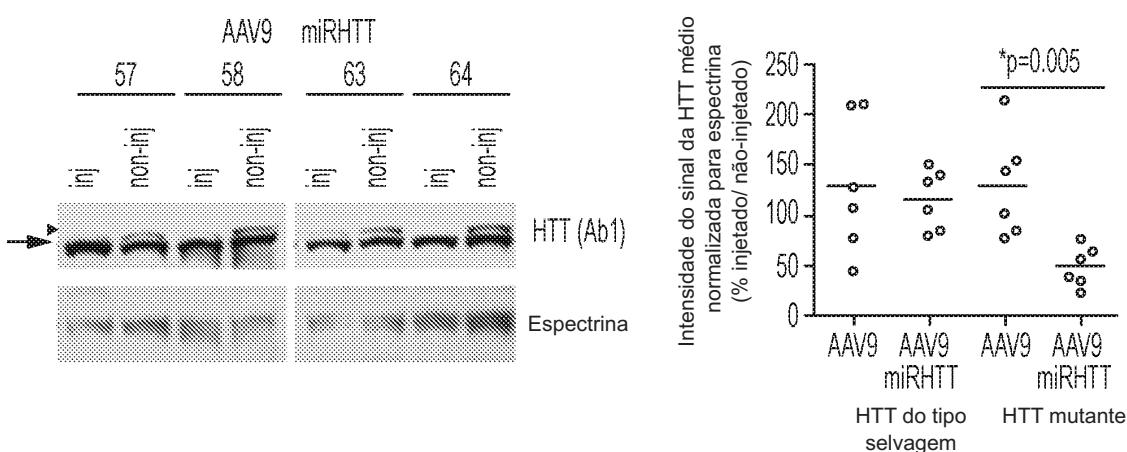


FIG. 29B

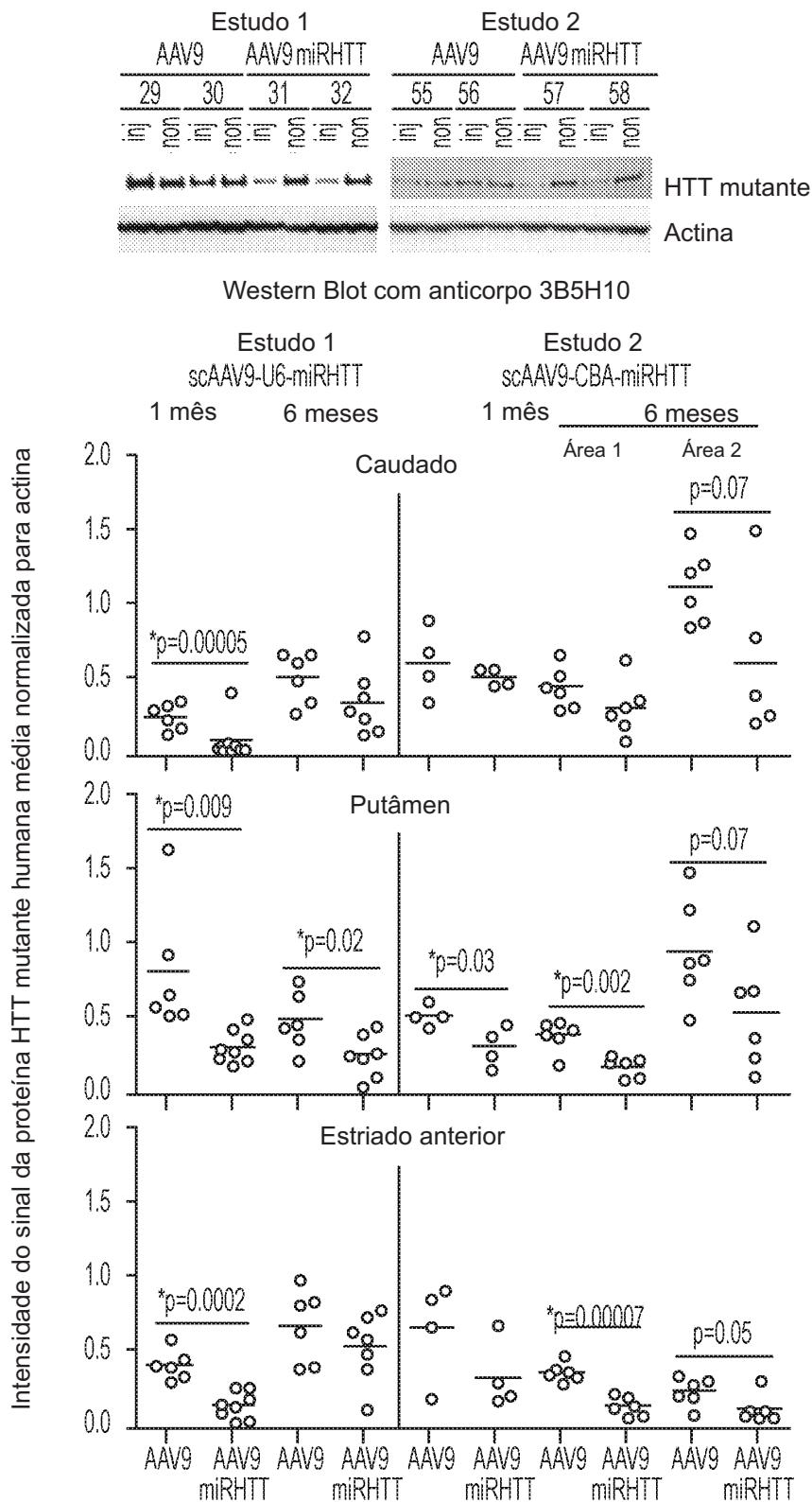


FIG. 30

Ensaio de detecção de Mesoescala com anticorpo mW1

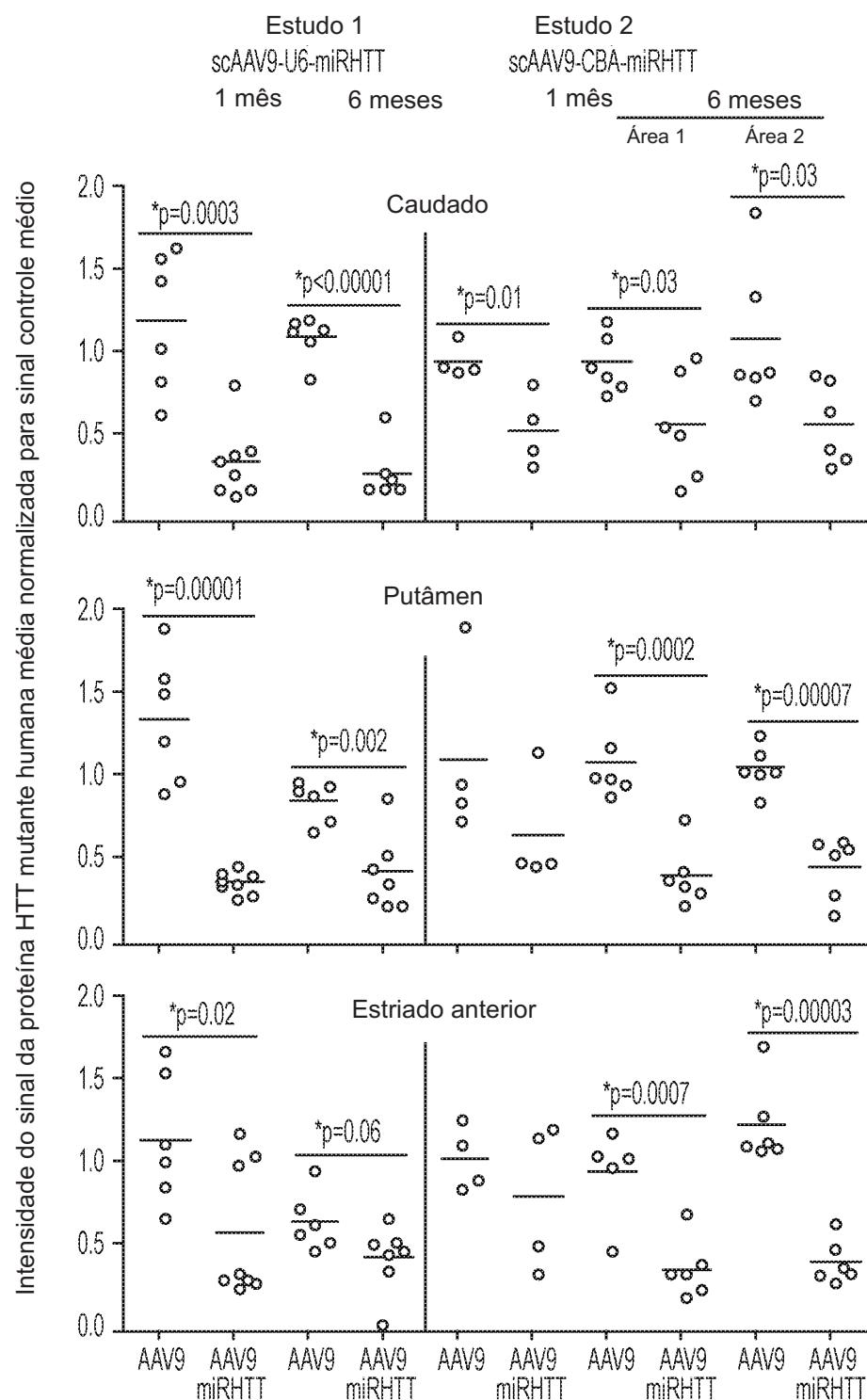


FIG. 31

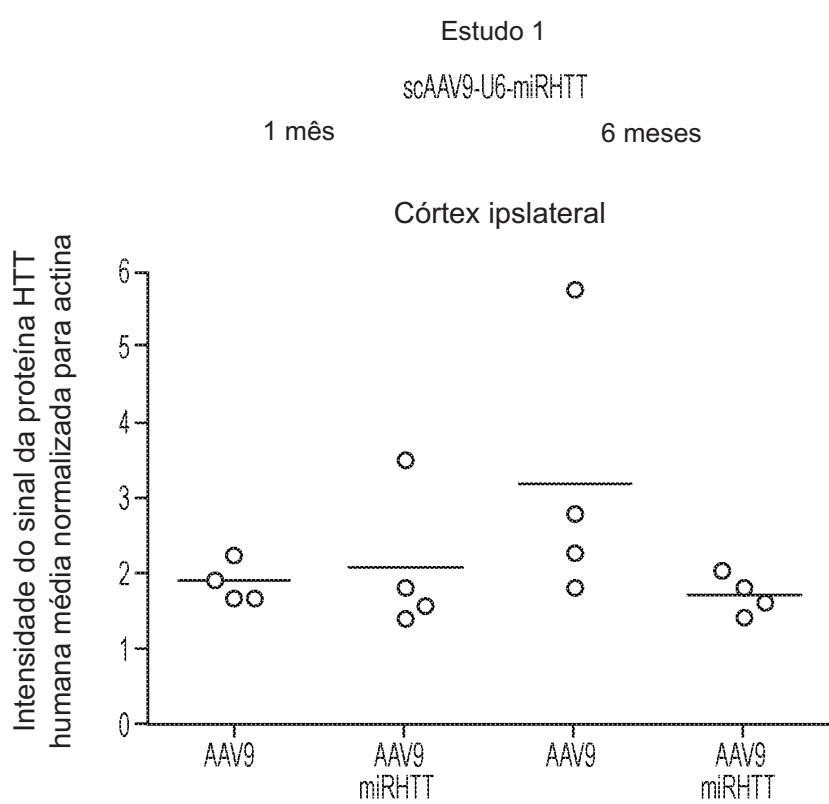


FIG. 32A

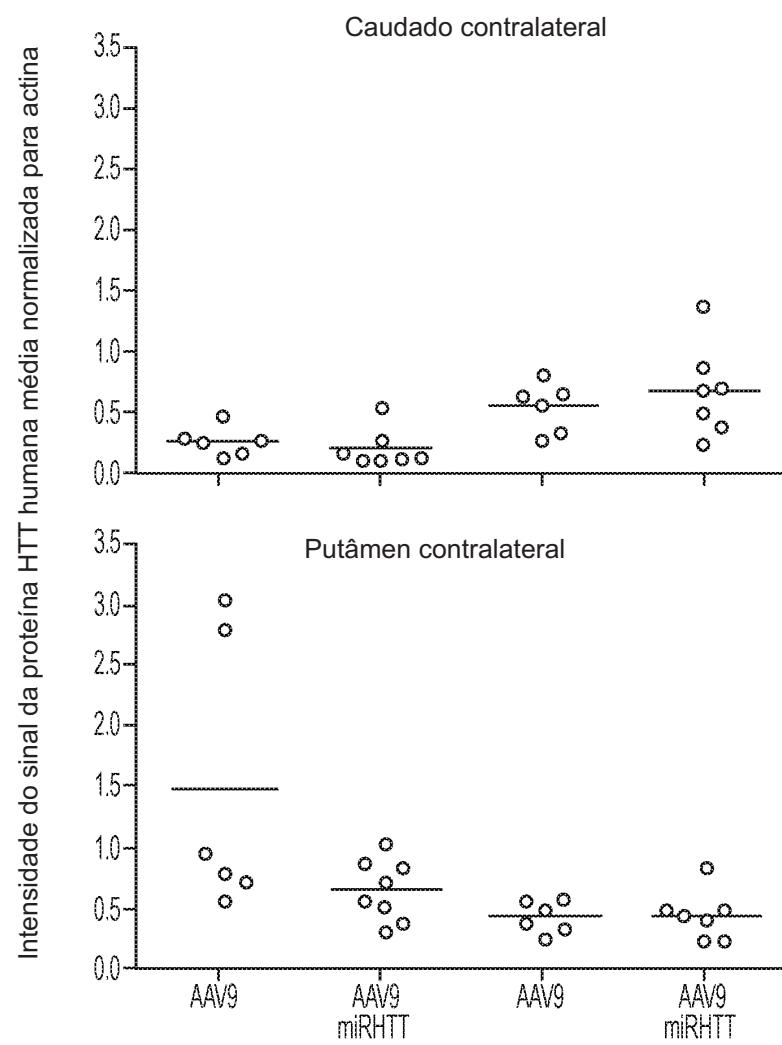


FIG. 32B