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

(21) BR 112021015281-4 A2

(22) Data do Depósito: 05/02/2020

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

(54) Título: ÁCIDOS NUCLEICOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE ALFA-HERPESVÍRUS

(51) Int. Cl.: C12N 15/86; C12Q 1/6897; C12Q 1/70.

(30) Prioridade Unionista: 05/02/2019 US 62/801,524; 19/12/2019 US 62/950,848.

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

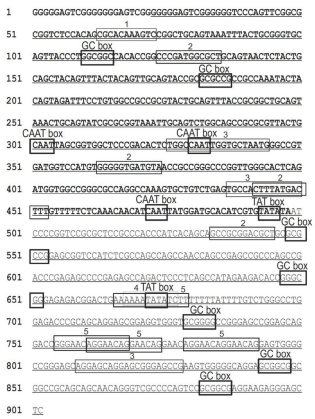
(72) Inventor(es): ESTEBAN ENGEL; CAROLA MATURANA; LYNN ENQUIST.

(86) Pedido PCT: PCT US2020016787 de 05/02/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/163475 de 13/08/2020

(85) Data da Fase Nacional: 03/08/2021

(57) Resumo: ÁCIDOS NUCLEICOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE ALFA-HERPESVÍRUS. A presente invenção refere-se a ácidos nucleicos recombinantes (por exemplo, vetores) e métodos relacionados, para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira. Os ácidos nucleicos recombinantes compreendem um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 8 e SEQ ID Nº: 9; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"ÁCIDOS NUCLEICOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE ALFA-HERPESVÍRUS".**

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Norte-americano Nº. 62/801.524, depositado em 5 de fevereiro de 2019, e do Pedido Provisório Norte-americano Nº. 62/950.848, apresentado em 19 de dezembro de 2019. Todos os ensinamentos dos pedidos acima são incorporados aqui referência.

ANTECEDENTES

[002] Os vírus infectam seus hospedeiros e introduzem seu material genético nas células do hospedeiro como parte de seu ciclo de replicação. Este material genético contém "instruções" básicas para a produção de mais cópias desses vírus, sequestrando a maquinaria de produção normal do corpo para atender às necessidades do vírus. A célula hospedeira seguirá essas instruções e produzirá cópias adicionais do vírus, fazendo com que mais e mais células do hospedeiro sejam infectadas. Como tal, os vírus podem ser usados como veículos para transportar genes que podem fornecer benefícios terapêuticos para uma célula.

SUMÁRIO

[003] Em um aspecto, a presente invenção fornece um vetor recombinante para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

[004] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um vetor recombinante para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

[005] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um vetor recombinante para expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

[006] Em algumas formas de realização, o pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento realçador. Em algumas formas de realização, o pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento indutor.

[007] Em algumas formas de realização, o vetor recombinante ainda compreende um elemento marcador selecionável.

[008] Em algumas formas de realização, o vetor é um vetor viral. Em certas formas de realização, o vetor viral é um vetor de vírus adenoassociado (AAV).

[009] Em algumas formas de realização, o vetor é um vetor não viral.

[0010] Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula de mamífero. Em algumas formas de realização, a célula

hospedeira é uma célula neuronal. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula não neuronal (por exemplo, uma célula do fígado, uma célula do rim, uma célula da retina).

[0011] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma célula hospedeira compreendendo um vetor recombinante como aqui descrito.

[0012] Em um aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3, e SEQ ID Nº: 4. Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com um sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

[0013] Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7, e SEQ ID Nº: 8. Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com um sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

[0014] Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9.

[0015] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de polinucleotídeo recombinante compreendendo um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende um ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

[0016] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de polinucleotídeo recombinante compreendendo um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende um ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

[0017] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula de polinucleotídeo recombinante compreendendo um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com SEQ ID Nº: 9.

[0018] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos

de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: o contato da célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4, em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira.

[0019] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: o contato da célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8, em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira.

[0020] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: o contato da célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico

está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9, em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira.

[0021] Em algumas formas de realização, a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transdução após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante. Em outra forma de realização, a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transfecção após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

[0022] As características das sequências de LAP aqui descritas incluem:

i) Tamanho menor quando comparado a promotores semelhantes, como EF1α, CAG, TH, CaMKIIa, entre outros. Esta é uma vantagem no contexto de vetores AAV que têm uma carga útil genética limitada.

ii) Expressão de longo prazo que é menos sujeita à repressão da transcrição. As sequências de LAP aqui descritas alcançam a transcrição crônica de longo prazo dos transgenes. Isto é particularmente útil para terapia gênica, onde o transgene terapêutico pode precisar ser expresso durante a vida do paciente/hospedeiro.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0023] O arquivo de patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado em cores. Cópias desta publicação de patente ou pedido de patente com desenho(s) colorido(s) serão fornecidas pelo Instituto mediante solicitação e pagamento da taxa necessária.

[0024] O precedente será aparente a partir da seguinte descrição mais particular de formas de realização exemplares, conforme ilustrado nos desenhos anexos, nos quais caracteres de referência

semelhantes se referem às mesmas partes ao longo das diferentes vistas. Os desenhos não estão necessariamente em escala, em vez disso, a ênfase é colocada na ilustração de formas de realização.

[0025] As **Figuras 1A-1D** representam a caracterização de promotores de transcrição associados à latência de PRV (LAPs). A **Figura 1A** representa a sequência de nucleotídeos completa de LAP de PRV de 902 pares de bases (pb) e as sub-regiões LAP1 de 498 pb (negrito e sublinhado), LAP2 de 404 pb (sublinhado) e LAP1_2 de 880 pb. LAP1_2 inclui a maioria das sequências de LAP1 e LAP2, mas não possui os primeiros 22 nucleotídeos de LAP1. As caixas pretas representam sequências de consenso para fatores de transcrição (TFs), incluindo, a caixa GC: proteína de especificidade 1 e 3 (Sp1 e Sp3); a caixa CCAAT: fator nuclear Y (NF-Y); e a caixa TATA: proteína de ligação a TATA (TBP). As caixas coloridas indicam as coordenadas para os sítios do motivo de ligação dos TFs: 1, verde: Caixa SRY 10 (SOX10); 2, vermelho: proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB); 3, azul: fator de ligação a CCCTC (CTCF); 4, marrom: fator de transcrição de oligodendrócitos 2 (Olig2); 5, rosa: transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT1). A Figura 1B descreve os mapas de plasmídeo dos quatro AAVs projetados para transcrever o mCherry repórter fluorescente de LAP1, LAP2, LAP1_2 e o promotor EF1α. WPRE de 609 bp é um elemento realçador pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota. Todos os AAVs contêm uma sequência de poliadenilação do hormônio de crescimento humano (hGH polyA) de 479 pb e repetições terminais invertidas (ITRs) flanqueadoras de AAV2 de 141 pb cada. Os vetores foram embalados no capsídeo do serótipo AAV-PhP.eB. O tamanho total dos elementos realçadores-promotores e da sequência promotora são: AAV-LAP1:1,87 Kb; AAV-LAP2: 1,77 Kb; AAV-LAP1_2: 2,25 Kb; e AAV-EF1α: 2,63 Kb. A Figura **1C** representa os quatro AAVs usados

para transduzir culturas primárias de neurônios SCG de rato para quantificar a expressão de mCherry em um lapso de tempo de 90 dias. A intensidade de fluorescência relativa da expressão de mCherry foi medida em 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 34, 38, 41, 45, 49, 52, 59, 67, 73, 82 e 90 dias após a infecção (dpi) com 3 x 1011 genomas de AAV. Barra de escala = 100 μm. Os dados são representados como média ± SEM; n = 3 pratos de cultura SCG por grupo. A Figura **1D** mostra que a expressão de mCherry conduzida por AAV em corpos celulares SCG em 28 dias após a transdução de AAV com LAP1-mCherry, LAP2-mCherry, LAP1_2-mCherry ouEF1α-mCherry.

[0026] As **Figuras 2A-2P** mostram expressão de transgene estável e de longo prazo mediada por LAP. A Figura **2A** é um diagrama esquemático da rota sistêmica de administração de AAV e processamento de tecido do SNC. As administrações intravenosas de vetores AAV foram realizadas por injeções unilaterais em seios retro-orbitais de camundongo (4 x 10^{11} vg/camundongo). Cérebros e medulas espinhais foram coletados em 30 dpi e 190 dpi. Os hemisférios direitos dos cérebros foram processados para limpeza de tecido iDISCO+ e análise de microscopia de luz folha. Os hemisférios esquerdos dos cérebros foram seccionados sagitalmente a 50 μm para imunofluorescência e análise de microscopia confocal. A medula espinhal foi cortada transversalmente a 20 μm para imunofluorescência e análise de microscopia confocal. As **Figuras** 2B-2P quantifica as densidades de células mCherry positivas por mm^3 em diferentes regiões do cérebro em amostras de tecido limpas com iDISCO+ em 30 dpi e 190 dpi. Os dados são representados como média ± SEM; n = 2 animais por grupo, e entre cinco e dez seções de 500 um por animal. Os dados foram normalizados para os de um animal de controle com injeção de veículo. A significância foi

determinada com o teste t de Student (se apenas dois grupos foram comparados), ou análise de variância unilateral (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni (se mais de dois grupos foram comparados). Um valor de $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo (*$p < 0,033$; **$p < 0,002$; ***$p < 0,001$).

[0027] As **Figuras 3A-3J4** mostram que todas as três sequências de AAV-LAP impulsionam a ampla difusão e a expressão de transgene de longo prazo através do cérebro após a injeção retro-orbital. Imagens de imunofluorescência representativas de seções sagitais mostram distribuições de todo o cérebro de manchamento anti-mCherry (verde) para AAV-LAP1 (**Figura 3A**), AAV-LAP2 (**Figura 3B**), AAV-LAP1_2 (**Figura 3C**) e AAV- EF1α (**Figura 3D**) a 190 dpi. Cx, córtex; Quadril, hipocampo; MRN, núcleo reticular do mesencéfalo; Cb, cerebelo; Thal, tálamo; Pn, pons; Hipo, hipotálamo; Str, Estriado; OB, bulbo olfatório. Barra de escala = 1 mm. Imagens confocais representativas mostram sinais anti-mCherry (verde) no córtex (**Figura** 3E), o giro dentado (**Figura 3F**), o estriado (**Figura 3G**) e o cerebelo (**Figura 3H**) a 30 dpi e 190 dpi. Todas as imagens são seções confocais da pilha. Barra de escala = 100 µm. As **Figuras 3I1-3I4** quantificar as intensidades de fluorescência indireta dos sinais anti-mCherry direcionados pelas sequências AAV-LAP e AAV-EF1α a 30 dpi e 190 dpi no córtex, giro dentado, estriado e cerebelo. As **Figuras 3J1-3J4** quantificar o número de células que expressam o sinal mCherry por pixels^2 por imuno-histoquímica (IHC) a 190 dpi no córtex, giro dentado, estriado e cerebelo. Os dados são representados como média ± SEM; n = 2 animais e seis seções de tecido por animal. Os dados foram normalizados para os de um animal controle com injeção de veículo. A significância foi determinada com o teste t de Student (se apenas dois grupos foram comparados), ou análise de variância unilateral (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de

Bonferroni (se mais de dois grupos foram comparados). Um valor de p < 0,05 foi estatisticamente significativo (*p < 0,033; **p < 0,002; ***p < 0,001).

[0028] As **Figuras 4A-4E4** mostram que LAP2 conduz a expressão de transgene estável e de longo prazo no cérebro. Imagens confocais representativas mostram fluorescência de mCherry nativa (vermelha) para AAV-LAP1, AAV-LAP2, AAV-LAP1_2 e AAV-EF1α no córtex (**Figura 4A**), o giro dentado (**Figura 4B**), o estriado (**Figura 4C**) e o cerebelo (**Figura 4D**) em 30 dpi e 190 dpi. Todas as imagens são seções confocais da pilha. Barra de escala = 100 µm. As **Figuras 4E1-4E4** quantifica as intensidades de fluorescência direta do sinal mCherry nativo conduzido por sequências AAV-LAP e AAV-EF1α a 30 dpi e 190 dpi é mostrado no córtex, giro dentado, estriado e cerebelo. Os dados são representados como média ± SEM; n = 2 animais e seis seções de tecido por animal. Os dados foram normalizados para os de um animal controle com injeção de veículo. A significância foi determinada com o teste t de Student (se apenas dois grupos foram comparados) ou análise de variância unilateral (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Bonferroni (se mais de dois grupos foram comparados). Um valor de p < 0,05 foi estatisticamente significativo (*p < 0,033; **p < 0,002; ***p < 0,001).

[0029] As **Figuras 5A-5E** mostram que AAV-LAP2 conduz a transcrição do transgene de longo prazo no SNC. A presença de mRNA de mCherry foi verificada por FISH em tecidos cerebrais a 190 dpi usando uma ribossonda específica para mCherry (verde). Os núcleos foram contrastados com DAPI (azul). As **Figuras 5A-5E** mostram fatias sagitais de 20 µm do cérebro para AAV-LAP2 ou AAV-EF1α no córtex, o giro do dentado, o estriado, o cerebelo e o bulbo olfatório, respectivamente. Os painéis 2 e 4 descrevem imagens de maior ampliação das regiões indicadas (quadrado) em Painéis 1 e 3,

respectivamente. As imagens são seções confocais da pilha. Barras de escala = 100 µm.

[0030] As **Figuras 6A-6F** mostram que a expressão do transgene AAV-LAP é predominantemente em neurônios e não em oligodendrócitos. Imagens confocais representativas da expressão de mCherry mediada por AAV (vermelho) em neurônios (**Figuras 6A** e **6B**: rótulo verde para o marcador pan-neuronal NeuN) oroligodendrócitos (**Figuras 6C** e **6D**: rótulo verde para o marcador de oligodendrócito Olig2) no córtex ou o giro dentado em 30 dpi. As células foram contrastadas com DAPI (azul). O sinal NeuN pode localizar-se no núcleo da célula neuronal, bem como no citoplasma, enquanto o manchamento para o sinal Olig2 é principalmente nuclear. As setas representam a co-rotulagem entre o marcador de célula e mCherry. Barra de escala = 100 µm. As **Figuras 6E** e **6F** quantificam a porcentagem de células marcadas com mCherry correspondentes a neurônios (NeuN-positivo) ou oligodendrócitos (Olig2-positivo) no córtex (Cx) ou giro dentado (DG) para cada promotor. As imagens são seções confocais da pilha. Os dados são representados como média ± SEM; n = 2 animais e seis seções de tecido por animal.

[0031] As **Figuras 7A-7D** mostram que a expressão do transgene AAV-LAP não é detectada na microglia e astrócitos. Imagens representativas de imunofluorescência confocal de sinal anti-mCherry (vermelho), microglia (**Figuras 7A** e **7B**: verde, marcado como Iba1-positivo), astrócitos (**Figuras 7C** e **7D**: verde, marcado como S100-positivo) no córtex e giro dentado em 30 dpi. As ausências de co-rotulagem entre mCherry em astrócitos e microglia são indicadas com estrelas (*). As células foram contrastadas com DAPI (azul). As imagens são seções confocais da pilha. Barra de escala = 100 µm.

[0032] As **Figuras 8A-8F** mostram que as sequências de LAP conduzem a expressão do transgene generalizada e de longo prazo

na medula espinhal. A medula espinhal (região lombar) foi seccionada transversalmente a 20 µm. Imagens confocais representativas a 190 dpi de expressão mCherry nativa mediada por AAV (vermelho, painéis 1 e 4), marcador neuronal NeuroTrace (verde, painéis 2 e 5) e sinal de fusão (amarelo, painéis 3 e 6) para AAV-LAP1 , AAV-LAP2, AAV-LAP1_2 e AAV-EF1α. As imagens são seções confocais da pilha. DH: corno dorsal; Corno ventral VH. Imagens de maior ampliação são mostradas nos painéis 4-6. Barra de escala = 100 µm.

[0033] As **Figuras 9A-9C** mostram que as sequências de LAP conduzem a expressão eficiente do transgene em células renais de suínos. Imagens representativas de células PK15 48 horas após a transfecção de um plasmídeo repórter compreendendo mCherry conduzido por LAP1 (**Figura 9A**), LAP2 (**Figura 9B**) ou LAP1_2 (**Figura 9C**). Painel 1:campo claro; Painel 2: fluorescência; Painel 3: mesclar. Barra de escala = 50 µm.

[0034] As **Figuras 10A** e **10B** mostram que LAP2 conduz a expressão de transgene eficiente em células de rim humano. Imagens representativas de células HEK-293 48 horas após a transfecção de um plasmídeo repórter compreendendo mCherry conduzido por LAP2 (**Figuras 10A**) ou o promotor EF1α (**Figuras 10B**). Painel 1:campo claro; Painel 2: fluorescência; Painel 3: mesclar. Barra de escala = 50 µm.

[0035] As **Figuras 11A** e **11B** mostram que LAP2 conduz a expressão de transgene eficiente em células de fígado humano. Imagens representativas de células HepG2 48 horas após a transfecção de um plasmídeo repórter compreendendo mCherry conduzido por LAP2 (**Figuras 11A**) ou o promotor EF1α (**Figuras 11B**). Painel 1:campo claro; Painel 2: fluorescência; Painel 3: mesclar. Barra de escala = 50 µm.

[0036] As **Figuras 12A1-12B4** mostram que LAP2 conduz a

expressão de transgene de longo prazo em todo o fígado. As administrações intravenosas de AAV-LAP2 (**Figuras 12A1-12A4**) ou vetor AAV-EF1α (**Figuras 12B1-12B4**) foram realizadas por injeção unilateral nos seios retro-orbitais de camundongo (4 x 10^{11} vg/camundongo). O fígado foi coletado a 190 dpi e seccionado longitudinalmente a 20 µm para análise de IHQ e microscopia confocal. Imagens confocais representativas de fluorescência de mCherry nativa (**Figuras 12A1** e **12B1:**vermelho), imunomanchamento anti-mCherry (**Figuras 12A2** e **12B2**: verde), contramanchamento nuclear DAPI (**Figuras 12A3** e **12B3**: azul) e imunofluorescência mesclada e Imagens DAPI (**Figuras 12A4** e **12B4**). CV: veia central. Barra de escala = 75 µm.

[0037] As **Figuras 13A1-13B4** mostram que LAP2 conduz a expressão de transgene de longo prazo no rim de camundongo. As administrações intravenosas de AAV-LAP2 (**Figuras 13A1-13A4**) ou vetor AAV-EF1α (**Figuras 13B1-13B4**) foram realizadas por injeção unilateral nos seios retro-orbitais de camundongo (4 x 10^{11} vg/camundongo). Os rins foram coletados a 190 dpi e seccionados longitudinalmente a 20 µm para análise de IHQ e microscopia confocal. Imagens confocais representativas mostram fluorescência de mCherry nativa (**Figuras 13A1** e **13B1:**vermelho), imunomanchamento anti-mCherry (**Figuras 13A2** e **13B2**: verde), contramanchamento nuclear DAPI (**Figuras 13A3** e **13B3**: azul) e imunofluorescência mesclada e Imagens DAPI (**Figuras 13A4** e **13B4**). AV: vaso arqueado. Barra de escala = 75 µm.

[0038] As **Figuras 14A1-14B4** mostram que LAP2 conduz a expressão de transgene de longo prazo na retina de camundongo. As administrações intravenosas de AAV-LAP2 (**Figuras 14A1-14A4**) ou vetor AAV-EF1α (**Figuras 14B1-14B4**) foram realizadas por injeção unilateral nos seios retro-orbitais de camundongo (4 x 10^{11}

vg/camundongo). As retinas foram coletadas a 190 dpi e criosseccionadas transversalmente a 20 µm para análise de IHQ e microscopia confocal. Imagens confocais representativas mostram fluorescência de mCherry nativa (**Figuras 14A1** e **14B1:**vermelho), imunomanchamento anti-mCherry (**Figuras 14A2** e **14B2**: verde), contramanchamento nuclear DAPI (**Figuras 14A3** e **14B3**: azul) e imunofluorescência mesclada e imagens de DAPI (**Figuras 14A4** e **14B4**). GCL: camada de células ganglionares; INL: camada nuclear interna; ONL: camada nuclear externa. Barra de escala = 75 µm.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0039] A seguir, uma descrição de formas de realização de exemplo

[0040] Vários aspectos da invenção são descritos abaixo, com referência a exemplos apenas para fins ilustrativos. Deve ser entendido que numerosos detalhes, relações e métodos específicos são apresentados para fornecer um entendimento completo da invenção. Alguém versado na técnica relevante, no entanto, reconhecerá prontamente que a invenção pode ser praticada sem um ou mais dos detalhes específicos ou praticada com outros métodos, protocolos, reagentes, linhagens celulares e animais. A presente invenção não é limitada pela ordem ilustrada de atos ou eventos, uma vez que alguns atos podem ocorrer em ordens diferentes e/ou simultaneamente com outros atos ou eventos. Além disso, nem todos os atos, etapas ou eventos ilustrados são necessários para implementar uma metodologia de acordo com a presente invenção. Muitas das técnicas e procedimentos descritos, ou referenciados neste documento, são bem compreendidos e comumente empregados usando metodologia convencional por aqueles versados na técnica.

[0041] A menos que definido de outra forma, todos os termos da técnica, notações e outros termos científicos ou terminologia usados

neste documento se destinam a ter os significados comumente entendidos por aqueles versados na técnica aos quais esta invenção pertence. Em alguns casos, os termos com significados comumente compreendidos são definidos neste documento para clareza e/ou para pronta referência, e a inclusão de tais definições neste documento não deve necessariamente ser interpretada como representando uma diferença substancial sobre o que é geralmente entendido na técnica. Será ainda entendido que os termos, tais como aqueles definidos em dicionários comumente usados, devem ser interpretados como tendo um significado que é consistente com o seu significado no contexto da técnica relevante e/ou conforme definido de outra forma neste documento.

[0042] A terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever formas de realização particulares apenas e não se destina a ser limitativa. Quando aqui usado, os artigos indefinidos "um", "uma" e "o(a)" devem ser entendidos como incluindo referência no plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

[0043] Quando aqui usado, um "sítio de clonagem" refere-se a um segmento curto de nucleotídeos no vetor que contém um ou mais sítios de restrição únicos que permitem a inserção de um "gene alvo" ou "gene de interesse" de nucleotídeo no vetor.

[0044] Quando aqui usado, um "promotor" refere-se a uma região de DNA à qual uma RNA polimerase se liga e inicia a transcrição (por exemplo, de um gene).

[0045] Quando aqui usado, um "elemento regulador não promotor" refere-se a sequência(s) não promotora(s) de uma molécula de ácido nucleico que são capazes de aumentar ou diminuir a expressão de genes específicos dentro do vetor recombinante. Tais elementos reguladores não promotores incluem, mas não estão limitados a, por exemplo, elementos realçadores, elementos indutores,

elementos silenciadores, regiões 5' não transladadas (UTRs), 3'UTRs, elementos terminadores, caixas CAAT, caixas CCAAT, caixas Pribnow, elementos SECIS, sinais de poliadenilação, caixas A, caixas Z, caixas C, caixas E, caixas G e elementos reguladores Cis (CREs).

[0046] Quando aqui usada, a frase "operacionalmente ligado" significa que o ácido nucleico está posicionado no polinucleotídeo recombinante, por exemplo, vetor, de tal forma que permite a expressão do ácido nucleico sob controle do elemento (por exemplo, promotor) ao qual está associado.

[0047] Quando aqui usado, um "elemento marcador selecionável" é um elemento que confere uma característica adequada para seleção artificial. Exemplos de elementos marcadores selecionáveis úteis na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, betalactamase, genes de resistência à neomicina, genes Fabl mutantes que conferem resistência ao triclosan, elementos URA3, produtos gênicos fluorescentes, marcadores de afinidade, tais como GST, His, CBP, MBP e marcas de epítopo, como Myc HA, FLAG. Os elementos do marcador selecionáveis podem ser marcadores de seleção negativos ou positivos.

[0048] A presente invenção fornece, em várias formas de realização, vetores, tais como vetores virais (por exemplo, vetores virais adenoassociados (AAV)), contendo sequências promotoras que são pequenas em tamanho, mas capazes de fornecer transcrição de longa duração de um gene de interesse. As sequências promotoras têm um tamanho que é menor do que muitos promotores comumente usados e podem conduzir a transcrição de um transgene na maioria dos tecidos e tipos de células (por exemplo, em mamíferos). As sequências promotoras aqui descritas são menos propensas a repressão ou inativação, tornando-as particularmente úteis para terapias gênicas que requerem expressão crônica de um transgene terapêutico.

[0049] Em um aspecto, a presente invenção fornece vetores de liberação de genes que expressam um gene de interesse. Em algumas formas de realização, o vetor de liberação de genes compreende um promotor derivado de uma região genômica de um genoma de alfa-herpesvírus, por exemplo, do vírus da pseudorraiva. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma região do promotor associado à latência (LAP) de um genoma de alfa-herpesvírus.

[0050] Em formas de realização particulares, a região LAP utilizada nos vetores da presente invenção é selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1 (também referida neste documento como LAP1), SEQ ID Nº: 2 (também referida neste documento como LAP2), SEQ ID Nº: 3 (também referido aqui como LAP1_2) e SEQ ID Nº: 4 (Tabela 1). LAP1_2 (880 pb) inclui uma sequência de 476 pb de LAP1 (498 pb) e a sequência LAP2 completa (404 pb), isto é, LAP1 e LAP2 em tandem, mas faltando os primeiros 22 pb da sequência LAP1. SEQ ID Nº: 4 (902 pb) compreende as sequências completas de SEQ ID Nº: 1 e SEQ ID Nº: 2, e é 22 bp mais longa do que SEQ ID Nº: 3.

[0051] Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

[0052] Sem desejar estar limitado pela teoria, acredita-se que certas porções ou fragmentos ativos de uma região LAP de um genoma de alfa-herpesvírus podem conduzir a expressão de um

transgene em uma variedade de tipos de células e tecidos. Em algumas formas de realização, o promotor usado na presente invenção compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9 (**Tabela 1**). SEQ ID Nº: 9 consiste em uma sequência "central" de 232 pb de LAP2 e inclui uma sequência de caixa TATA. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9.

[0053] Sem desejar ser limitado pela teoria, as sequências de LAP ainda compreende SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11 e/ou SEQ ID Nº: 12 (**Tabela 1**) podem ter desempenho transcricional melhorado. Consequentemente, em algumas formas de realização, o promotor ainda compreende SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação dos mesmos, por exemplo, no 5' ou 3' de SEQ ID Nº: 9. SEQ ID Nº: 10 (o motivo "CTCF") demonstrou estar envolvido na regulação epigenética da expressão do gene do vírus do herpes, remodelação da cromatina e recrutamento de fatores de transcrição e proteínas (Lang *et al*., 2017, Lee *et al*., 2018). SEQ ID Nº: 11 (o motivo "CTCF alternativo com estabilizador a montante") demonstrou estabilizar um motivo CTCF alternativo e facilitar a ligação de mais quatro domínios de ligador de zinco (Zimmerman *et al*., 2018). SEQ ID Nº: 12 (o motivo "fator de transcrição nuclear Y (NF-Y)") é reconhecido por um fator de transcrição que se liga à caixa CAAT localizada nas regiões promotoras de vários eucariotos (Chikhirzhina *et al*., 2008; Fleming *et al*., 2013).

Tabela 1. Sequências de Ácido Nucléico do Promotor Associado à Latência (LAP)

SEQ ID Nº:	Sequência de Ácido Nucleico
LAP1 (498 bp) SEQ ID Nº: 1	GGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGTCCCAGTTCG GCGCGGTCTCCACAGCGCACAAAGTCCGGCTGCAGTAAATTTACTGCGG GTGCAGTTACCCTGGCGGCCACACCGGCCCGATGGCGCTGCAGTAACTC TACTGCAGCTACAGTTTACTACAGTTGCAGTACCGCGCGCCGCCGCCAAA TACTACAGTAGATTTCCTGTGGCCGCCGCGTACTGCAGTTTACCGCGGCT GCAGTAAACTGCAGTATCGCGCGGTAAATTGCAGTCTGGCAGCCGCGCGT TACTGCAATTAGCGGTGGCTCCCGACACTCTGGCCAATTGGTGCTAATGG GCCGTGATGGTCCATGTGGGGGTGATGTAACCGCCGGGCCCGGTTGGGC ACTCAGATGGTGGCCGGGCGCCAGGCCAAAGTGCTGTCTGAGTGCCACT TTATGACTTTGTTTTTCTCAAACAACATCAATTATGGATGCACATCGTGT**ATATA**
LAP2 (404 bp) SEQ ID Nº: 2	ATCCCCGGTCCGCGCTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGC GCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCC AGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACA CCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGG GCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGC CGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACA GGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGC AGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGC GAGGAAGAGGGAGCTC
LAP1_2 (880 bp) SEQ ID Nº: 3	GGGGGAGTCGGGGGGTCCCAGTTCGGCGCGGTCTCCACAGCGCACAAA GTCCGGCTGCAGTAAATTTACTGCGGGTGCAGTTACCCTGGCGGCCACAC CGGCCCGATGGCGCTGCAGTAACTCTACTGCAGCTACAGTTTACTACAGT TGCAGTACCGCGCGCCGCCGCCAAATACTACAGTAGATTTCCTGTGGCCG CCGCGTACTGCAGTTTACCGCGGCTGCAGTAAACTGCAGTATCGCGCGGT AAATTGCAGTCTGGCAGCCGCGCGTTACTGCAATTAGCGGTGGCTCCCGA CACTCTGGCCAATTGGTGCTAATGGGCCGTGATGGTCCATGTGGGGGTGA TGTAACCGCCGGGCCCGGTTGGGCACTCAGATGGTGGCCGGGCGCCAG GCCAAAGTGCTGTCTGAGTGCCACTTTATGACTTTGTTTTTCTCAAACAAC ATCAATTATGGATGCACATCGTGT**ATATA**ATCCCCGGTCCGCGCTCCGCC CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCG CCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAG AGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTG AAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGA GCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGG AGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAG CAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC

(902 bp) SEQ ID Nº: 4	GGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGTCCCAGTTCG GCGCGGTCTCCACAGCGCACAAAGTCCGGCTGCAGTAAATTTACTGCGG GTGCAGTTACCCTGGCGGCCACACCGGCCCGATGGCGCTGCAGTAACTC TACTGCAGCTACAGTTTACTACAGTTGCAGTACCGCGCGCCGCCGCCAAA TACTACAGTAGATTTCCTGTGGCCGCCGCGTACTGCAGTTTACCGCGGCT GCAGTAAACTGCAGTATCGCGCGGTAAATTGCAGTCTGGCAGCCGCGCGT TACTGCAATTAGCGGTGGCTCCCGACACTCTGGCCAATTGGTGCTAATGG GCCGTGATGGTCCATGTGGGGGTGATGTAACCGCCGGGCCCGGTTGGGC ACTCAGATGGTGGCCGGGCGCCAGGCCAAAGTGCTGTCTGAGTGCCACT TTATGACTTTGTTTTTCTCAAACAACATCAATTATGGATGCACATCGTGT**AT** **ATA**ATCCCCGGTCCGCGCTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGC TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCG CCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAG ACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTC TGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGA GCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGA ACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGG GGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGC GGCGAGGAAGAGGGAGCTC
Herpesvírus equino SEQ ID Nº: 5	GGGCTCGGCGGCGGGGAGCCTCGGTGATGGGCAGCACCAGGGGCTCGG CCTCGGCGTCGGGCTCCAGCAGCGCCACCCGGCAGAACTCGCTCAGCAG CTCGGGGATCAGAAGCTCCGAGGGCTCCACGGCCCCAGCGCCGCGCCG GCCGCAGGCGAGGTACACGGGGCGCAGCCAGGCCCCGAGTCCCCATCG GTTGGCCGCGCGGTGGCTCTGCGCGGCGCCCTCCTCAAAGTCCGGGTCG TGGAACCCGAGGCCCTCGGCCTGGGCCCGCATGTCCTTGCAGCCGTCGT AGTCGGGCAGGACGCGCTGGCGGTACTCCCTCGGAGCCAGGGGAACGC GGGTGCGCTCGCCGGCGCGAGTGTCCACCGTGTAGGCCACGTTGGAGG AGCGGCACAGCCTCAGGGGCGCAGAGTCCGGGTACAGGCGCGCGAACG CGGCCTCGGCCCTCGCGAACAGTCCGGGCCCGAAGAGGGTGCTGGAGG TGAGGACCGCGCGGCTGAGGTGGCGCTCCCGGGGCCAGCGCACGGCGC AGGCGACCCGCGGAGTCAGGGCGGCCCGCATGTAGATGTGGTACTGGCT GATCGCGGGACCGTCCTGGGGCCAATCCTCGGTGGAGACCGCGTCCAGC ACCAGGAGCTTGCGCCTGGCGGAGCCCAGGCGCAGGCAGAGGTACTCG ACGCAGCCGGTGAAGGCCAGGTCCCCGGTCGACAGCAGCAGGACCCCCT GGGCGTTGAGGGCCGAGACGTCCGGGGCCCCGGTCCAGTTGCCGGCCC AGGCGTGGGACCGCTTGGTGAGGATGCGGTTCCCCAGGGCCGCCAGCA GCGCCGAGAGTCCCCCCTTGAGGTCGGACCAGAGGGGCTCGCGCCGAG AGCCGCCGGGGCGGGAGGCCGGGAGTCCGCCCAGCAGGTCCTCGTCCT GGAGCGGGGAGTAGAGGACCACCACCTTCACGTCCTCGGGGTCGGGGAT CTGGTGCATCCAGGCGGCCCTCCGTCTCAGCGGGCCGCTGGCCGCCAG CTCCCCGAAGCGCGCGCCGTCCCGGGCCGGGGGGCCGCT

Herpesvírus bovino SEQ ID Nº: 6	GCTCCAGTCGACGCCGCCCCGGCCGTGCTGCTCCAGGAACGCGTTGGCC TCGGCAAAGTGCGTGCAGTGAACGAAGGGCGCTCGTGACAGCGGCGAGG GGTGGCTGTACGTCAGCACGAGGTGCCGCTTCCCGGCCGCCCCAAAGGC CCGCTGGGCGTGCGCGCCCCAGAGCATGAACACCAGCGGGCCGCTCTC CGCGCTCAGGCGGGCCAGTACCGCGTGCACCAGCCGCCCCCAGCCCAG GCTAGAGTGCGAGCCCGGCGCCCCGCTCCGCACGGTGAGCGAGGTGTTA AGCAGCAGCACGCCGCGGCGCGCCCAGTCCTCTAGGCAGCCGTGCGAC GGCCGCGGAGCTCCGGGAAAGTTCTTCTGCACGGCAGCGTAGATGTTCT GGAGGCTGGGTGGGACCGGAACGCCGCGGTTCACGCTAAAAGCCAAGCC GTGGGCTTGCCCGCGGCTGTGATAGGGGTCCTGGCCCAGAATGACAACC TTGATGTCCTCGGGTGCCGCGTAACGCGTCCACGCGAAGATGTCCGCTTT CGGAGGCAGCACTTGCTCGACGCGGCTCCGGCGCTCGTATTCGCGCAGC GCGTGTCGCGTGTAGGGCATGGCCAGCTCGGGTTCCAGCACGCGCCGCC AGGCTTCGTGGACGCCAAATTCAGCGGCGAATGCCCCCCAAGTAATGGCA CGCTGGTCTTCTAGCGCTGTTACGCACGCGGGAAGTCCATTGGGGCGCC GGCGCTTGGGCGGCGCGGCACCCCGCAAGCGGGGACAAAGACTTTCGG CGCGTTTGGGCCGAAGCCGGGGCCGAAGCCGGGGCCGAAGCCGGGGCC GAAGCCGGGGCCGAAGCCGGGGCCGAAGCCGGGGCCGAAGCCGGGGC CGGGGCCGGGGCCGGGGCATCGCTAGCGGTAGATGCCGTCGCCAGGGC CGCAGGGACCAGTCGTGTGGTATCGGGGCGGCAGGACGCAC
vírus da varicela-zoster SEQ ID Nº: 7	CGGGGAGGTGGGGTCGCTTTTTTTTTTCTCTCTCGAGGGGGCCGCGAGA GGGCTGGCCTCCTCTCCCGGGGTCCGCCGGGCGCCCAGAAACCGGGGGG GGGGTTATTTTCGGGGGGGGGTCCGACCAGCCCGCCCGTCGCCCGCCC GCACAGACAGACAGACACTTTTTTCATAAAAACCGTTCCGCTTTTATTAACA ACAAACAGTCCGCGCGCCAGTGGCGCTCACGAGAAAAGGAGGGGACTCC GTCACCCCCGACTCTGCGGGGGGCTCCTCCCCCCGCGCCCTCCCCACAC ATCGTCCTCGTCCTCGGAGGACGAGGACGAGGACAACAGCTCCACCTTG ACCGCCGGGCGCAAACCCACCCGGCGGTCTCGCAGCACACCCGGGGCC ACCGACACGATGCTCACCCCAAAGGATGACCCCGGTGCGTCCCCGTCGT CCCCGCCCCCCTCCTCGCTGTCCCACGCGTCTTCACACCCCACCTCCCAA TCGTCCAGCTCCAAAGCGTGTTCTCTGTCGTCTGCGGTGCGCCGCTGTCG CCCCGCCTGGGTTTCTGACGGCCGTTCCGAGCCCCCGTGGTGTCCGAAC ACGAACCGTGTTCCGTCGCTCCCCTCCAACACCGTCTCCGCGGCCCCAAA ACCGGGCGGCCACATTACTCTGGGAATCGGGGGGAGGGCATTCCGAGCC TCGTCCGCCGACGCATACAGCGCCACCGACCGACCGGCCACGGGTGGAA GCACGAGTGGTTCTGCGGCAGGGTCGGGTTCCAGCAGGGCGTGGCGGC AAAACACCCTCGCCCAGGTGGGTACGTCGCCGGCCTCCGGCCCGGCGG CCCCCGGTCTCCGTCCCTCGGGAAGGAAGACGGGTCGAAGCGCGGCAC CCAGGCCCCATCGGTTTGCTGCGCGGTGGCTATGTGCCGCCTCGTCCAC AAAGTCGGCTGCCCCGAGCCCCAGACCCCGAGACTGTCGCGCGAGGTC

Herpesvírus1 SEQ ID Nº: 8	GAGCGCGGCGCGCCAGGCCTCGGGGAAGAGCGGGTGGTCGGTCAGCTC GGCGACGACGCGCGGGGCGCAGTAGGCCTCGAGGGCGGCGGCGGAGG GCGCCGGCGTGTGGCTGGGCCCCGGCGGCACGCGGCGCCAGCCGCCG CGGGGGTCGGGCCCGGCGGGCGGTCGCGCCGTCAGCGCGGCGGGCCG CGGGCGCGGGCCCGGGGCCGGCGGCCCCGGGGGCGGGGCCGCGGCG CCGGGCCGGCTCTTCTTGCGCGCCGGCGGGCAGGCGGCGGCGGCGGC GGGCGGGCGCGCCGGCGAGGAGCTCTTGCGCTTGCGCGCCGGCGGGC GCGCGGCGCCGCCCGCGTCTGCGTCGGCCAGCAGGGGGCGCAGGCTCT GGTTCTGGAAGAGCAGGTCGGCGGCGGCGGCGCCGGCGGAGCGCACCT GGCGCGGGCCGCGCGCCAGCAGCGGCGCGGCGGCGCCGGCGACGAGG CTGACGGCGCGCACGGCGGCGACGGCGGCCTCGGCGCCGCCGGCGAC GCGGAGGTCCCCGCGCAGGCGCATGAGCACCAGCGCGTCGCGCGTGCG GCGCAGCTCGCGCAGCCAGAGGCGCGGGCGCGGCGGCGCGGCGGCGG GGCCGCGCGGCGGCGGCACGGCGCGCGCGGCCGCCAGCCCGGGCACG GCGGCCAGGTCGCCGCCGTAGCCCTCGGCCAGCGCCTCCAGCACGGCG CGGCAGGCCGTGAGGCACTCGGCGGCGGCGGCGGCCGCGGCGTCGTC GTCGTCGTCGTCCTCGTCCTCCCCCGCGGCCCCGGCGGGGCCGTCCTCC CCGGCGCCGGCGGGGCCCTCGTCGGAGAGGGCGGCCGCCAGGCGGCG CTGCGCGGCGATGACGCCCGCGGCGCCGTACCCGGCGGGAACGGCGGG GACCGCGGCGGCGTCGGGCTCGGGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG CGCCCGCCGCGGCGGCGTTCTCGCGCGCCAGCAGGGGCGCGTACGCGC GCCGCAGGCTGGTGATGAGGAAGCCC
SEQ ID Nº: 9	**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGG AGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAG GAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCA ACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
SEQ ID Nº: 10	CCGCGAGGAGGCAG
SEQ ID Nº: 11	TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA
SEQ ID Nº: 12	TCAGCCAATCAGCGAG
LAP2.1 (232 bp) SEQ ID Nº: 13	**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGG AGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAG GAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCA ACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.2 (246 bp) SEQ ID Nº: 14	**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGG AGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAG GAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCA ACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*CCGCGAGGA*

	GGCAG
LAP2.3 (266 bp) SEQ ID Nº: 15	**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGG AGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAG GAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCA ACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*TGGTGCCCT CTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA*
LAP2.4 (248 bp) SEQ ID Nº: 16	*TCAGCCAATCAGCGAG***ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGAC CCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGA CCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGG CCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGC GGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAG GGAGCTC
LAP2.5 (246 bp) SEQ ID Nº: 17	*CCGCGAGGAGGCAG***ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACC CGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGAC CGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGC CGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCG GCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGG GAGCTC
LAP2.6 (266 bp) SEQ ID Nº: 18	*TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA***ATATA**TCTTTTTTTATTT TGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCC GGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC AGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGT GGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTC CGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.7 (248 bp) SEQ ID Nº: 19	**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGT GGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCC GAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAG TCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*TCAGCCAATCAGCGAG*
LAP2.8 (236 bp) SEQ ID Nº: 20	AAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAG CGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGA ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGA GCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGC AGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.9 (250 bp) SEQ ID Nº: 21	AAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAG CGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGA ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGA GCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGC AGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*CCGCG AGGAGGCAG*

LAP2.10 (270 bp) SEQ ID Nº: 22	AAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAG GAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAA CAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGG AGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGC GGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAG GGAGCTC*TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA*
LAP2.11 (252 bp) SEQ ID Nº: 23	*TCAGCCAATCAGCGAG*AAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCT GGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCG GAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC AGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGG GGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTC CGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.12 (250 bp) SEQ ID Nº: 24	*CCGCGAGGAGGCAG*AAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTG GAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGG AGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACA GGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGG GCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCC GCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.13 (270 bp) SEQ ID Nº: 25	*TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA*AAAA**ATATA**TCTTT TTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGG TGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAAC AGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGG AGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGC AACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.14 (252 bp) SEQ ID Nº: 26	AAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAG GAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAA CAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGG AGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGC GGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAG GGAGCTC*TCAGCCAATCAGCGAG*
LAP2.15 (329 bp) SEQ ID Nº: 27	CAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGC CAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTG AAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCA GGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGA ACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGG GAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGG CGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGA GGGAGCTC

LAP2.16 (383 bp) SEQ ID Nº: 28	CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCG CCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAG AGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTG AAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGA GCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGG AGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAG CAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.17 (397 bp) SEQ ID Nº: 29	CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCG CCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAG AGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTG AAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGA GCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGG AGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAG CAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*CCGC GAGGAGGCAG*
LAP2.18 (417 bp) SEQ ID Nº: 30	CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCG CCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAG AGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTG AAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGA GCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGG AGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAG CAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*TGGT GCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA*
LAP2.19 (399 bp) SEQ ID Nº: 31	*TCAGCCAATCAGCGAG*CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCC GGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGA CCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGC GGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGG AGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGC AGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTG GGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGC GGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAA GAGGGAGCTC

LAP2.20 (397 bp) SEQ ID Nº: 32	*CCGCGAGGAGGCAG*CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAG CGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGA GCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGAC GGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCA GGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGC AGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAA CAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.21 (417 bp) SEQ ID Nº: 33	*TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA*CACCCATCACAGCAGC CGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCA GCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCA GCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTT TTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGC GGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC AGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGC CGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCC CCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.22 (399 bp) SEQ ID Nº: 34	CACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCG CCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAG AGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTG AAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGA GCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGG AACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGG AGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAG CAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC*TCAG* *CCAATCAGCGAG*
LAP2.23 (386 bp) SEQ ID Nº: 35	GCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCAT CTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCC CGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGG ACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGC AGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAA CAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAG CAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCC GCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.24 (387 bp) SEQ ID Nº: 36	CGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCA TCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCC CGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGG ACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGC AGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAA CAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAG CAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCC GCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC

LAP2.25 (388 bp) SEQ ID Nº: 37	CCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCA TCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCC CGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGG ACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCA GGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACA GGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAG GAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAG CAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.26 (391 bp) SEQ ID Nº: 38	GCTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGG TCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGA GCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAG ACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCG CAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCG GGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCG GGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGC GGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGA GCTC
LAP2.27 (358 bp) SEQ ID Nº: 39	TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCG CCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAG ACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTC TGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGA GCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGA ACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGG GGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGC GGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.28 (372 bp) SEQ ID Nº: 40	TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCG CCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAG ACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTC TGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGA GCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGA ACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGG GGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGC GGCGAGGAAGAGGGAGCTC*CCGCGAGGAGGCAG*
LAP2.29 (392 bp) SEQ ID Nº: 41	TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCG CCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAG ACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTC TGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGA GCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGA ACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGG GGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGC GGCGAGGAAGAGGGAGCTC*TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAAT TGCA*

LAP2.30 (374 bp) SEQ ID Nº: 42	*TCAGCCAATCAGCGAG*TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGC CAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACT CCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATAT** **A**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGT GGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAAC AGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGC GGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAG GGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.31 (372 bp) SEQ ID Nº: 43	*CCGCGAGGAGGCAG*TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCC AACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTC CCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA** TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTG GGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACA GGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCG GGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGG GTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.32 (392 bp) SEQ ID Nº: 44	*TGGTGCCCTCTGGTGGTCTTCTAGAGGAATTGCA*TGCGCGCCGGAGCGG TCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGA GCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAG ACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCG CAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCG GGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCG GGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGC GGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGA GCTC
LAP2.33 (374 bp) SEQ ID Nº: 45	TGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCG CCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAG ACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTC TGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGA GCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGA ACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGG GGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGC GGCGAGGAAGAGGGAGCTC*TCAGCCAATCAGCGAG*
LAP2.34 (255 bp) SEQ ID Nº: 46	GGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCC TGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGG AGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGA GTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGG AGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAG GAAGAGGGAGCTC

LAP2.35 (257 bp) SEQ ID Nº: 47	CGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.36 (268 bp) SEQ ID Nº: 48	ATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.37 (313 bp) SEQ ID Nº: 49	CCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.38 (339 bp) SEQ ID Nº: 50	TCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.39 (359 bp) SEQ ID Nº: 51	CTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.40 (364 bp) SEQ ID Nº: 52	GGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC

LAP2.41 (368 bp) SEQ ID Nº: 53	CCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACC AGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCA GCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTT TTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGC GGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAAC AGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGC CGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCC CCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.42 (376 bp) SEQ ID Nº: 54	CACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCC AGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAG ACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACTGAAAAA**A** **TATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGGAGCGGA GGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAGGAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAGGAGCAG GAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCAGCAGCA ACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.43 (384 bp) SEQ ID Nº: 55	CCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCTC GCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCGA GAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGACT GAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAGG AGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACAG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCAG GAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGCA GCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.44 (385 bp) SEQ ID Nº: 56	CCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGTCCATCT CGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAGCCCCG AGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGACGGAC TGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGCAGCAG GAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGGGAACA GGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGGGAGCA GGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCGGCCGC AGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGCTC
LAP2.45 (390 bp) SEQ ID Nº: 57	CTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGGAGCGGT CCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACCCGAGAG CCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGGGAGAGA CGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAGACCCGC AGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAGGACCGG GAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGGCCGG GAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGCG GCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAG CTC

LAP2.46 (396 bp) SEQ ID Nº: 58	TCCGCGCTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCGCCGG AGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCGACC CGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGCGG GAGAGACGGACTGAAAAA**ATATA**TCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTGGAG ACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAG GACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGG GCCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGG CGGCGGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGA GGGAGCTC

A sequência "nuclear" de 232 pb (SEQ ID Nº: 9) está sublinhada.

A sequência de DNA da caixa TATA (ATATA) está sublinhada e em negrito.

O motivo "CTCF" (SEQ ID Nº: 10), o motivo "CTCF alternativo com estabilizador a montante" (SEQ ID Nº: 11) e o motivo "NF-Y" estão em itálico.

[0054] Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com sequências de ácido nucleico selecionadas a partir de SEQ ID Nºs: 13-58 (**Tabela 1**). Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58.

[0055] Os vetores que compreendem as sequências de LAP aqui descritas podem ser usados para liberação de genes (por exemplo, em mamíferos, como um ser humano) e pesquisa básica e translacional. A célula hospedeira pode ser uma célula cultivada (ou seja, *in vitro*) ou residir em um indivíduo (por exemplo, em um modelo animal (ou seja, *in vivo*)).

[0056] Em algumas formas de realização, o vetor é um vetor de liberação de gene de lentivírus, um vetor de liberação de gene de retrovírus ou um vetor de liberação de gene de adenovírus. Uma

vantagem das sequências de LAP aqui descritas é que elas têm um tamanho consideravelmente menor do que outros promotores comumente usados em vetores virais, mas podem sustentar a transcrição prolongada em diferentes tipos de células.

[0057] Uma região LAP relativamente pequena pode ser vantajosa, uma vez que a capacidade de carga útil de DNA é altamente limitada em vetores. Por exemplo, a capacidade de empacotamento ou carga útil dos vetores AAV é limitada a um tamanho máximo de aproximadamente 5.000 bp. Em algumas formas de realização, a região LAP utilizada nos vetores da presente invenção está entre cerca de 200 bp e cerca de 410 bp de comprimento, por exemplo, cerca de 220-410 bp, cerca de 220-400 bp, cerca de 240-400 bp, cerca de 240- 380 bp, cerca de 260-380 bp, cerca de 260-360 bp, cerca de 280-360 bp, cerca de 280-340 bp, cerca de 300-340 bp ou cerca de 320-340 bp de comprimento.

[0058] Em formas de realização particulares, as sequências de promotor da presente invenção podem ser usadas quando a expressão forte e de longo prazo de transgenes é necessária em células em cultura, em animais ou em humanos. Os promotores são úteis em situações onde há restrições de espaço do genoma, mas a atividade de transcrição do promotor de longa duração é necessária. Os AAVs são particularmente úteis para terapia genética humana; como tal, as sequências de LAP da presente invenção fornecem aplicações de terapia genética quando utilizadas com AAVs.

[0059] Em algumas formas de realização, um gene de interesse é expresso sob o controle das sequências de LAP fornecidas neste documento por pelo menos cerca de 30 dias, cerca de 60 dias, cerca de 90 dias, cerca de 120 dias, cerca de 150, cerca de 180 dias ou cerca de 190 dias *in vitro*. Em algumas formas de realização, um gene de interesse é expresso sob o controle das sequências de LAP

fornecidas neste documento por pelo menos cerca de 30 dias, cerca de 60 dias, cerca de 90 dias, cerca de 120 dias, cerca de 150, cerca de 180 dias ou cerca de 190 dias *in vivo* (por exemplo, em um tecido como o cérebro). Em algumas formas de realização, um gene de interesse é expresso sob o controle das sequências de LAP fornecidas neste documento por pelo menos cerca de 30 dias, cerca de 60 dias, cerca de 90 dias, cerca de 120 dias, cerca de 150, cerca de 180 dias ou cerca de 190 dias *ex vivo* (por exemplo, em células em cultura, como neurônios).

[0060] Em um aspecto, a presente invenção fornece um vetor recombinante para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

[0061] Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4

[0062] As sequências de LAP aqui descritas podem ser usadas

em uma variedade de vetores de expressão gênica, como um plasmídeo, um cromossomo bacteriano artificial (BAC), um cosmídeo ou outros sistemas não virais ou virais para expressar transgene (s).

[0063] Em algumas formas de realização, o vetor é um vetor viral. Em algumas formas de realização, o vetor viral é um vetor de vírus adenoassociado (AAV). Exemplos não limitativos de vetores virais que podem ser utilizados pela presente invenção incluem vetores virais de DNA ou RNA, incluindo, mas não se limitando a vetores retrovirais, vetores de vírus de herpes, vetores de adenovírus, vetores de lentivírus, vetores de vírus da raiva, vetores de lentivírus, vetores de VSV, vetores do vírus da vacínia de vírus, vetores de reovírus, vírus da floresta Semliki, vírus da febre amarela e vetores do vírus sindbis.

[0064] Em algumas formas de realização, o vetor é um vetor não viral. Os vetores não virais podem ser DNA de plasmídeo, complexos de lipossoma-DNA (lipoplexos) e complexos de polímero-DNA (poliplexos). Os vetores não virais podem ser RNA plasmídico, complexos lipossoma-RNA (lipoplexos) e complexos polímero-RNA (poliplexos). Os oligonucleotídeos e seus análogos, sozinhos ou em complexos, também são possíveis construções de transferência de genes mediadas por vetores não virais.

[0065] Os vetores (por exemplo, vetores virais) fornecidos neste documento podem ser usados para expressar transgenes terapêuticos em órgãos ou tecidos de modelos animais e humanos, por exemplo, em terapias genéticas para tratar doenças adquiridas ou herdadas (por exemplo, do sistema nervoso).

[0066] As sequências de LAP aqui descritas foram derivadas do genoma do vírus da pseudorraiva (PRV). O PRV é um alfa-herpesvírus capaz de infectar vários animais. Embora o hospedeiro natural seja o porco adulto, o PRV pode infectar uma ampla gama de vertebrados, incluindo gado, ovelha, cão, pássaro, gato, cabra,

guaxinim, galinha, furão, gambá, porquinho-da-índia, cavalo, coelho, rato, camundongo e não humano primatas (Pomeranz *et al*., 2005). As células humanas cultivadas também são suscetíveis à infecção por PRV e infecções zoonóticas de PRV em humanos foram relatadas (Wong *et al*., 2019).

[0067] Além de ser capaz de infectar várias espécies animais diferentes, o PRV também é um vírus pantrópico. Isso significa que a maioria dos tecidos e órgãos de um hospedeiro infectado podem ser suscetíveis e permissivos à infecção por PRV (Blanchard *et al*., 2006; Boldogkoi *et al*., 2000; Fan *et al*., 2019; Gasparini *et al*., 2019; Pomeranz *et al*., al., 2005). Portanto, as sequências de LAP podem ser potencialmente utilizadas para terapias gênicas em diversos tipos de células e tecidos.

[0068] Em outro aspecto, a presente invenção fornece uma célula hospedeira compreendendo um vetor recombinante como aqui descrito. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula de mamífero (por exemplo, uma célula neuronal). Em outras formas de realização, a célula hospedeira é selecionada a partir de uma célula de pássaro, uma célula de peixe, uma célula anfíbia e uma célula de réptil. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula neuronal de um indivíduo. Em algumas formas de realização, a célula neuronal reside em uma área motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação hipocampal, estriado, pálido, tálamo, hipotálamo, uma área do mesencéfalo, cérebro, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo. Em algumas formas de realização, a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada

ao motor, uma área relacionada aos sentidos ou ambas. Em algumas formas de realização, a célula neuronal reside no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo. Em algumas formas de realização, a célula neuronal compreende um neurônio, uma célula da microglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos. Em algumas formas de realização, a célula neuronal compreende um neurônio.

[0069] Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula do osso, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula do intestino, uma célula do estômago, uma célula do rim, uma célula do fígado, uma célula do pulmão, uma célula muscular, uma célula pancreática, uma célula da retina, uma célula sexual, uma célula da pele, uma célula do baço, uma célula tronco e uma combinação das mesmas. Em algumas formas de realização, a célula hospedeira é uma célula cancerosa.

[0070] Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, em pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de

realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico que codifica o gene alvo compreende mais do que cerca de 4 kb.

[0071] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece uma molécula polinucleotídica recombinante compreendendo um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende um ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

[0072] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um vetor recombinante para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira. SEQ ID Nº: 5 compreende uma sequência LAP de um vírus do herpes equino; SEQ

ID Nº: 6 compreende uma sequência LAP de um vírus do herpes bovino; SEQ ID Nº: 7 compreende uma sequência LAP de um vírus da varicela-zoster; e SEQ ID Nº: 8 compreende uma sequência LAP de um herpesvírus Macacino 1 (Tabela 1). Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionado de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

[0073] Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, em pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico que codifica o gene alvo compreende mais do que cerca de 4 kb.

[0074] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece

uma molécula de polinucleotídeo recombinante compreendendo um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende um ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

[0075] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um vetor recombinante para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID Nº: 10, SEQ ID

Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58.

[0076] Em algumas formas de realização, o pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento realçador. Em algumas formas de realização, o pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento indutor. Em algumas formas de realização, o vetor recombinante ainda compreende um elemento marcador selecionável.

[0077] Em outro aspecto, a presente invenção fornece moléculas polinucleotídicas recombinantes compreendendo um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de

ácido nucleico com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico que codifica o gene alvo compreende mais do que cerca de 4 kb.

[0078] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma molécula polinucleotídica recombinante compreendendo um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência para SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, em pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58. Em algumas formas de realização, o promotor

compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nºs: 13-58.

[0079] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: o contato da célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4, em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionado de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

[0080] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: o contato da célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico

está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8, em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionado de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

[0081] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, compreendendo: o contato da célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9, em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor compreende a

SEQ ID Nº: 9. Em algumas formas de realização, o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico da SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID 6 % 13-58. Em algumas formas de realização, o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID 6 % 13-58.

[0082] Em algumas formas de realização, a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo. Em algumas formas de realização, a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal. Em algumas formas de realização, a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

[0083] Em algumas formas de realização, a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transdução (por exemplo, infecção por um vetor viral) após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante. Em outra forma de realização, a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transfecção após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante. Em outra forma de realização, a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por eletroporação após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

[0084] Os vetores virais adenoassociados recombinantes (AAV) são ferramentas neurocientíficas essenciais para definir a conectividade e a função do sistema nervoso central (SNC). Além

disso, os AAVs são usados como vetores de terapia gênica para tratar doenças do SNC herdadas e adquiridas. Apesar de sua segurança e amplo tropismo, questões importantes precisam ser corrigidas, como a capacidade de carga útil limitada e a falta de pequenos promotores de genes que fornecem expressão de transgene pan-neuronal de longo prazo no SNC. Os promotores gênicos comumente usados são relativamente grandes e podem ser reprimidos alguns meses após a transdução viral do SNC, arriscando o desempenho de longo prazo das aplicações de terapia gênica de dose única.

[0085] Melhorias recentes em AAVs recombinantes, incluindo modificação de capsídeo e novos promotores de genes para otimizar a expressão do transgene, melhoraram substancialmente as aplicações de terapia gênica (Mak, Rajapaksha *et al*. 2017; Hudry e Vandenberghe 2019; Ogden, Kelsic *et al*. 2019). Os vetores AAV são amplamente utilizados em neurociências e aplicações clínicas devido à sua segurança, amplo tropismo dependente de sorotipo e eficiência de transdução (Aschauer, Kreuz *et al*. 2013; Samulski e Muzyczka 2014; Mak, Rajapaksha *et al*. 2017). A variante PHP.eB de AAV-9 (Chan, Jang *et al*. 2017), com uma capacidade realçada de permear a barreira hematoencefálica de camundongo (BBB) e transduzir amplamente neurônios no cérebro e na medula espinhal após a administração vascular periférica, é um exemplo de melhorias recentes do capsídeo (Dayton, Grames *et al*. 2018). A principal limitação dos AAVs recombinantes é seu pequeno capsídeo com capacidade de carga útil limitada de apenas ~ 4,9 kb (Russell e Hirata 1998). Consequentemente, a descoberta de sequências promotoras curtas que sustentam uma transcrição forte e de longa duração é fundamental para expandir a carga útil do transgene e atingir o efeito terapêutico crônico com uma dose viral.

[0086] Vários promotores fortes, como enolase específica de

neurônio (NSE, 1800 bp) (Peel, Zolotukhin *et al*. 1997; Delzor, Dufour *et al*. 2012), proteína cinase II alfa dependente de cálcio/calmodulina (CaMKIIa, 1300 bp) (Sohal , Zhang *et al*. 2009) e fator de alongamento humano 1 alfa (EF1α, 1264 bp) (Sohal, Zhang *et al*. 2009; Qin, Zhang *et al*. 2010) foram usados na liberação sistêmica de AAV (Bedbrook, Deverman *et al*. 2018). No entanto, o tamanho considerável dessas sequências promotoras (Bedbrook, Deverman *et al*. 2018) limita o uso de grandes transgenes terapêuticos ou múltiplos pequenos transgenes. Além disso, promotores curtos, como o promotor e realçador precoce imediato de citomegalovírus humano (CMV, 600 bp) (Gray, Foti *et al*. 2011) ou versões truncadas do promotor de sinapsina humana (hSyn, 468 bp) (Jackson, Dayton *et al*., 2016), têm consideravelmente mais fracos para conduzir a transcrição e expressão do gene e, em alguns casos, são completamente reprimidos ou inativados apenas semanas após o parto (Brooks, Harkins *et al*. 2004; Nathanson, Jappelli *et al*. 2009; Qin, Zhang *et al*. . 2010; Back, Dossat *et al*. 2019). Da mesma forma, pequenos promotores ubíquos como beta glicuronidase (GUSB, 378 bp) (Husain, Passini *et al*. 2009) ou ubiquitina C (UBC, 403 bp) (Qin, Zhang *et al*. 2010; Powell, Rivera-Soto *et al*. 2015) mostraram níveis de transcrição fracos.

[0087] Três promotores associados à latência de alfa-herpesvírus (LAP), denominados LAP1 (498 bp), LAP2 (404 bp) e LAP1_2 (880 bp) obtidos do genoma do vírus da pseudorraiva do herpesvírus (PRV), são descritos e validados neste documento. A subfamília *Alphaherpesvirinae*, da família *Herpesviridae*, inclui herpesvírus-1 bovino (BHV-1), vírus da varicela-zoster (VZV), herpesvírus simples (HSV) e PRV. Esses vírus compartilham a organização do genoma e estabelecem infecções latentes nos gânglios sensoriais de diferentes hospedeiros mamíferos (Koyuncu, Hogue *et al*. 2013).

[0088] A região LAP de PRV engloba dois promotores independentes, LAP1 e LAP2 (Cheung 1989; Cheung e Smith 1999; Jin e Scherba 1999; Jin, Schnitzlein *et al*. 2000) (**Figura** 1A). LAP de PRV1 contém duas caixas GC e três caixas CAAT a montante da primeira caixa TATA. LAP de PRV2 contendo duas caixas GC antes da segunda caixa TATA (Cheung 1989; Jin e Scherba 1999; Taharaguchi, Kobayashi *et al*. 2002). Foi proposto que a ligação de diferentes fatores de transcrição (TFs) aos elementos promotores de consenso presentes no LAP pode facilitar o escape do silenciamento do nucleossoma durante a infecção latente durante a infecção latente (Deshmane e Fraser 1989; Leib, Bogard *et al*. 1989; Devi-Rao, Goodart *et al*. 1991; Jin, Schnitzlein *et al*. 2000; Ono, Tomioka *et al*. 2007). Em linhagens de camundongos transgênicos, a transcrição promovida por LAP de PRV é específica para neurônios na ausência de infecção por PRV (Taharaguchi, Yoshino *et al*. 2003). No entanto, em ensaios de expressão transiente, LAP de PRV1 e LAP2 promovem a transcrição tanto em células neuronais em cultura quanto em células não neuronais (Cheung e Smith 1999; Taharaguchi, Kobayashi *et al*. 2002). Além disso, a atividade das sequências em tandem LAP1 e LAP2 é significativamente aumentada em comparação com LAP1 ou LAP2 sozinhas (Cheung e Smith 1999).

[0089] Aqui, uma abordagem de rastreamento de todo o SNC com base na liberação sistêmica retro-orbital de AAV-PHP.eB, limpeza de tecido iDisco+ e microscopia de luz folha, foi usada para identificar três pequenos promotores associados à latência (LAP) do vírus da pseudorraiva do herpesvírus (PRV). Esses promotores são LAP1 (404 pb), LAP2 (498 pb) e LAP1_2 (880 pb). Eles conduzem a transcrição crônica da transcrição associada à latência codificada pelo vírus (LAT) durante as fases produtivas e latentes do ciclo infeccioso do PRV. A transcrição e translação do transgene pan-neuronal estável foram

observadas a partir de AAV-LAP no cérebro e medula espinhal durante seis meses após a transdução de AAV. Os dados sugerem que os LAPs são candidatos adequados para terapias gênicas do SNC baseadas em vetores virais que requerem expressão de transgene crônica após administração única de vetor viral, LAP de PRV1, LAP2 e promotores LAP1_2 em tandem são provavelmente adequados para aplicações de liberação de genes sistêmicos, menos invasivos, pan-neuronais que podem exigir a expressão de transgene crônica estável após uma única administração.

Exemplo 1. Materiais e Métodos

Construção de sequências de LAP de PRV

[0090] O promotor da transcrição associado à latência (LAP) de PRV foi amplificado por PCR a partir das coordenadas 95106-96007 do genoma da cepa Becker de PRV (GenBank: JF797219.1). A região LAP1 (498bp), foi amplificada usando pares de iniciadores LAP1F (5'- GCA CGC GTA TCT CCG GAA AGA GGA AAT TGA -3') (SEQ ID Nº: 59) e LAP1R (5'- GCG GAT CCT ATA TAC ACG ATG TGC ATC CAT AAT -3')(SEQ ID Nº: 60). A região LAP2 (404bp), foi amplificada usando pares de iniciadores LAP2F (5'- GCA CGC GTA TCC CCG GTC CGC GCT CCG CCC ACC CA -3') (SEQ ID Nº: 61) e LAP2R (5'- GCG GAT CCG AGC TCC CTC TTC CTC GCC GCG GAC TGG -3')(SEQ ID Nº: 62). LAP1_2 (902 pb) abrangendo toda a região LAP foi amplificado usando LAP1F e LAP2R (Cheung e Smith 1999). As regiões 5' e 3' dessas sequências de PCR continham os sítios de restrição MluI e BamHI, respectivamente, usados para clonagem direcional no vetor pAAV-Ef1α-mCherry. pAAV-Ef1α-mCherry foi um presente de Karl Deisseroth (plasmídeo Addgene # 114470). Os três plasmídeos AAV-LAP foram construídos por dupla digestão do vetor pAAV-Ef1α-mCherry com MluI e BamHI seguido por subclonagem do fragmento LAP apropriado a montante do gene repórter mCherry,

flanqueado por repetições terminais invertidas de AAV2 (ITRs) e terminado com o sinal de SV40 poliA.

Construção de vetores AAV

[0091] Todas as cassetes de expressão foram embaladas em capsídeos AAV-PhP.eB (presente de Daniela Gradinaru, Addgene plasmídeo # 103005) no Princeton Neuroscience Institute Viral Core Facility e purificadas por gradiente de etapas de iodixanol e ultrafiltração em coluna como descrito anteriormente (Zolotukhin, Byrne *et al* 1999; Chan, Jang *et al*. 2017). Os genomas virais protegidos por capsídeo foram medidos por TaqMan qPCR e relatados como cópias do genoma por mililitro (GC/ml).

Animais

[0092] Os estudos em animais foram realizados de acordo com as diretrizes e protocolos aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee of Princeton University (protocolo # 1943-16 and 1047). Timed-pregnant Sprague-Dawley rats were obtained from Hilltop Labs Inc. (Scottsdale, PA). Embriões de rato E17 foram colhidos para isolamento de neurônios SCG simpáticos. Camundongos machos C57BL/6J de tipo selvagem adultos (4 a 6 semanas de idade) foram obtidos de Jackson Laboratory (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Os camundongos tiveram pelo menos 48 horas de aclimatação às instalações de espera no biotério do Princeton Neuroscience Institute antes da realização dos procedimentos experimentais.

Cultura de Células de Gânglios Cervicais Superiores Primários

[0093] Os neurônios SCG de embriões de rato (E17) foram cultivados em tricâmaras, conforme descrito anteriormente (Curanovic, Ch'ng *et al*. 2009). Resumidamente, SCG foram dissociados com tripsina (2,5 mg/ml, Sigma-Aldrich, The Woodlands, TX) e semeados em placas revestidas com poli-O-Ornitina e laminina

com meio contendo meio neurobasal suplementado com B-27 2 %, 100 ng/ml fator de crescimento do nervo (NGF) e 1 % de penicilina-estreptomicina-glutamina (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Aproximadamente dois terços de um único gânglio foram colocados no compartimento S (soma) da tricâmara. Três dias após a semeadura, o meio de cultura foi tratado com citosina-D-arabinofuranosídeo 0,1 mM, Ara C (Sigma-Aldrich, The Woodlands, TX) por pelo menos 2 dias para eliminar células não neuronais em divisão. O meio de cultura foi substituído a cada 5 dias e os neurônios foram incubados a 37°C com 5% de CO_2.

Injeção no seio retro-orbital

[0094] A administração intravenosa de vetores AAV foi realizada em camundongos por injeção unilateral no seio venoso retro-orbital (Yardeni, Eckhaus *et al*. 2011). Os animais foram anestesiados com coquetel de cetamina (80 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg) antes do procedimento. Uma vez sem resposta, os animais foram colocados em decúbito lateral para injeção no canto medial. O volume de injeção foi de 100 µl contendo um total de 4 x 10^{11} genomas virais administrados com uma seringa de insulina 29G1/2. Os animais foram colocados em almofadas de aquecimento reguladas e monitorados até a ambulância.

Processamento de Tecido e Procedimentos Histológicos

[0095] Os camundongos foram anestesiados com uma overdose de cetamina (400 mg/kg)/xilazina (i.p.) e perfundidos com paraformaldeído a 4% (PFA) 30 e 190 dias após a infecção (dpi). O cérebro e a medula espinhal foram pós-fixados durante a noite em 4% de PFA a 4°C. Após lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS), os cérebros foram armazenados a 4°C em PBS com 0,1% de azida de sódio. Os cérebros foram divididos em duas partes com os hemisférios esquerdos seccionados sagitalmente a 50 µm

usando um vibratome Leica VT1200 e a 20 µm usando um criostato Leica CM3050 S. Os hemisférios direitos foram usados para o protocolo de limpeza de tecido iDISCO+ (abaixo). Cérebros fixos e medula espinhal foram incubados em série em 10% de sacarose, 20% de sacarose e 30% de sacarose a 4°C para crioproteção. Os tecidos foram incluídos em OCT (tissue-Tek, Torrance, CA), congelados em gelo seco e armazenados a -80°C até o corte. Para criossecção, as medulas espinhais foram colocadas em um molde de incorporação (Sigma-Aldrich, The Woodlands, TX) e preenchidas com agarose ultrapura de baixo ponto de fusão (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) a 37°C. O cubo de agarose semissólido foi removido e colado (Loctite, Rocky Hill, CT) na orientação horizontal para corte transversal a 20 µm usando um criostato.

Imunomanchamento

[0096] Para imuno-histoquímica, seções de cérebro flutuantes foram lavadas com PBS e bloqueadas por 1h com albumina de soro bovino (BSA) a 3%, soro de burro a 2% e Triton X-100 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As amostras foram incubadas com anticorpos primários durante a noite a 4°C e anticorpos secundários por 1h em temperatura ambiente (temperatura ambiente) diluídos em PBS contendo BSA 1%, soro de burro 1% e Triton X-100 0,5%. Os núcleos das células foram contrastados com 0,5 µg/ml de DAPI durante 5 minutos (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Os seguintes anticorpos primários foram usados: coelho anti-RFP Rockland (1:1000; Limerick, PA), frango anti-mCherry Abcam (1:500; Cambridge, MA), camundongo anti-NeuN (1:500; Millipore Bioscience Research Reagents, Temecula, CA), anti-Olig2 de coelho (1:500, EMD Millipore, Temecula, CA), anti-Iba1 de coelho (1:1000, Wako Chemical, Richmond, VA) e anti-S100 de coelho (1:5000, Dako, Glostrup, Dinamarca). Os seguintes anticorpos secundários foram

usados: IgG anti-coelho de burro Alexa Fluor 488, IgG anti-rato de burro Alexa Fluor 488, IgG anti-coelho de burro Alexa Fluor 647, IgG anti-galinha de burro Alexa Fluor 647 (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). As seções de flutuação livre da medula espinal foram manchadas com diluição 1:300 de mancha verde fluorescente Nissl NeuroTrace 500/525 (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 1 hora. As seções foram permeabilizadas com Triton X-100 0,1% em PBS aos 10 minutos e lavadas primeiro com PBS seguido de PBS com Triton X-100 0,1% durante 10 minutos. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/ml de DAPI durante 5 min e depois lavadas com PBS durante 2 horas em temperatura ambiente. O meio de montagem Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL) foi aplicado às seções do cérebro e da medula espinhal antes da montagem.

Microscopia

[0097] Culturas de SCG neuronais foram imageadas com um microscópio de epifluorescência invertida Nikon Ti-E (Nikon Instruments Inc, Tokyo, Japan), contendo uma câmera Cool Snap ES2 (Photometrics, Tucson, AZ) e objetiva 4X. Imagens lado a lado de todo o compartimento S foram montadas com o software Nikon NIS Elements. Para quantificar a eficácia de transdução de AAV em várias regiões do cérebro, fatias de cérebro foram imageadas com um scanner de microscópio fluorescente NanoZoomer S60 (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan). Fatias do cérebro foram imageadas com um microscópio de varredura a laser confocal Leica STP8000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) usando objetivas 20X e 63X, detectores híbridos (HyD) para detecção sensível e mais de uma área de 1024 x 1024 pixels. O software ImageJ foi usado para calcular a fluorescência celular total corrigida, conforme relatado anteriormente (Maturana, Aguirre *et al*. 2017). As células foram selecionadas

desenhando uma região de interesse (ROI) e normalizadas para a intensidade de fundo de células não fluorescentes. O cálculo da fluorescência celular total corrigida foi medido como intensidade relativa de fluorescência (RFI) considerando a área integrada, densidade e valor médio de gray de cada célula.

Limpeza de tecidos com iDISCO+

Permeabilização

[0098] Os hemisférios cerebrais direitos foram usados para limpeza de tecidos com iDISCO+. As amostras de cérebro foram fixadas durante a noite em 4% PFA antes da limpeza do tecido, conforme descrito anteriormente (Renier, Wu *et al*. 2014). As amostras fixas foram lavadas/desidratadas em soluções de 20, 40, 60, 80, 100% de metanol/água por uma hora cada, seguido por 5% de peróxido de hidrogênio/metanol lavagem durante a noite (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e reidratação com um gradiente reverso de metanol/água 100, 80, 60, 40, 20% por uma hora cada. Finalmente, os cérebros foram lavados com 0,2% de Triton X-100/PBS, seguido por 20% de DMSO (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)/0,3 M de glicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/0,2% de Triton X- 100/PBS a 37°C durante 2 dias.

Imunomarcação

[0099] As amostras foram incubadas em uma solução de bloqueio de DMSO a 10%/soro de burro a 6% (EMD Millipore, Temecula, CA)/0,2% de Triton X-100/PBS a 37°C por 2-3 dias, seguido por duas lavagens de uma hora, em PBS/Tween-20 a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) com 10 µg/ml de heparina (solução doravante referida como PTwH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os cérebros foram incubados com anticorpo primário de coelho anti-RFP (1:1000; Rockland, Limerick, PA) em 5% de DMSO/3% de soro de burro/PTwH a 37°C durante 7 dias. Em seguida, os cérebros foram lavados com

PTwH 5 vezes (intervalos de lavagem: 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, uma hora, duas horas) e incubados a 37°C por 7 dias com IgG anti-coelho de burro Alexa Fluor 647 secundário (1:450, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) em 3% de soro de burro/PTwH e depois lavado em PTwH por 5 vezes.

Limpeza de tecido

[00100] Os cérebros foram sequencialmente desidratados em 20, 40, 60, 80, 100% de metanol/água por uma hora cada etapa, seguido por 2:1 diclorometano (DCM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)/metanol e lavagens 100% de DCM. Finalmente, as amostras foram limpas com DBE (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e armazenadas no escuro em temperatura ambiente até que imageadas.

Microscopia de luz folha e análise de tecido limpo

[00101] Após a imunomarcação e limpeza, os volumes cerebrais foram adquiridos usando um ultramicroscópio de luz folha II (LaVision Biotec, Bielefeld, Germany). As metades do cérebro foram coladas na orientação horizontal em um suporte impresso em 3D de design personalizado (Renier, Wu *et al*. 2014; Renier, Adams *et al*. 2016) e submersas em DBE. Os cérebros foram imageados no canal autofluorescente para fins de registro com uma excitação de diodo a laser de 488 nm e um filtro de emissão máxima de 525 nm (FF01-525/39-25, Semrock, Rochester, NY), e em excitação de 640 nm com um filtro de emissão máxima de 680 nm (FF01-680/42-25, Semrock) para imagem celular de células infectadas com AAV (anti-RFP). Imagens separadas com iluminação autofluorescente dos lados esquerdo e direito foram adquiridas a cada 10 micrômetros (tamanho de etapas z) usando uma folha de excitação NA de 0,017 e ampliação de 1,3x. As imagens dos lados esquerdo e direito foram mescladas sigmóide na linha média. Volumes autofluorescentes foram registrados no atlas cerebral de Allen volumétrico (2015) usando

transformações afins e b-spline, conforme descrito por Renier e colegas (Renier, Wu *et al*. 2014; Renier, Adams *et al*. 2016). Para contabilizar o movimento durante a aquisição e diferentes parâmetros de imagem entre os canais, os volumes do sinal celular foram registrados em volumes autofluorescentes com uma transformação afim. Os volumes do cérebro foram analisados com nosso software ClearMap modificado: "ClearMap_cluster" (github.com/PrincetonUniversity/clearmap_cluster), compatível com clusters de computação de alto desempenho. Para todas as amostras analisadas, os objetos detectados nas bordas do cérebro e ventrículos foram desgastados em 75 µm da borda da estrutura para minimizar falsos positivos.

Hibridização *in situ* de RNAscope

[00102] As criosseções cerebrais foram montadas em superfrost mais lâminas de adesão (Thermo Fisher, Waltham, MA) e armazenadas a -80°C. O manchamento de RNA foi realizado usando o kit de reagente fluorescente multiplex RNAscope (Advanced Cell Diagnostics (ACD), Newark, CA) seguindo o protocolo do fabricante. A sonda mCherry ACD # 431201-C2 foi usada. As fatias foram pré-tratadas com protease IV por 30 minutos a 40°C, seguido de incubação da sonda por duas horas a 40°C. Em seguida, diferentes soluções de amplificador foram realizadas por 30 minutos, 30 minutos e 15 minutos a 40°C. O sinal foi detectado com o sistema TSA mais fluoresceína (Perkin Elmer, Waltham, MA). As etapas de incubação foram realizadas no sistema de hibridização ACD HybEZ. As lâminas foram contrastadas com DAPI durante 30 segundos em temperatura ambiente e depois lavadas duas vezes com PBS. Finalmente, as lâminas foram montadas com meio de montagem antidesbotamento VECTASHIELD Vibrance (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Estatisticas

[00103] A análise estatística dos dados foi realizada usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). O teste de Student bicaudal foi usado para comparar entre dois grupos, e o teste ANOVA unilateral não paramétrico seguido por um pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni para comparar entre vários grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi estatisticamente significativo. Os dados são representados como a média com SEM.

Exemplo 2. Sequências pequenas de LAP de PRV podem conduzir a expressão do transgene em neurônios independentemente da infecção por herpesvírus.

[00104] A região LAP de PRV inclui pelo menos duas regiões promotoras definidas aqui como LAP1 e LAP2 (**Figura 1A**). No genoma de PRV, LAP1 e LAP2 estão presentes em tandem como LAP de PRV1_2. Estas sequências, sozinhas ou combinadas, são capazes de expressão eficiente de transgenes repórter em neurônios simpáticos primários quando usadas em vetores AAV sem infecção por PRV (**Figuras 1C** e **1D**). As sequências de LAP foram analisadas para identificar elementos reguladores putativos usando o software Jasper (Sandelin, Alkema *et al*. 2004; Wasserman e Sandelin 2004), o RSAT (Nguyen, Contreras-Moreira *et al*. 2018) e o CTCFBSDB 2.0 (Ziebarth, Bhattacharya *et al*. 2013). Três motivos de ligação da proteína de ligação ao elemento de resposta de AMP cíclico (CREB) foram detectados a montante da caixa TATA de LAP1 e um foi detectado a montante da caixa TATA de LAP2. Além disso, dois motivos de ligação do fator de ligação CCCTC (CTCF) foram detectados a montante da caixa TATA de LAP1 e um foi detectado a jusante da caixa TATA de LAP2. Os elementos promotores a jusante (DPE) foram identificados em LAP2, incluindo três caixas CG e quatro transdutores de sinal e motivos de ligação do ativador da transcrição 1

(STAT1). Além disso, havia TFs determinantes de linhagem (Wang, Pol *et al*. 2014), como Caixa SRY 10 (SOX10) e fator de transcrição de oligodendrócitos 2 (Olig2), a montante da caixa LAP1 TATA e da caixa TATA de LAP2, respectivamente (**Figura 1A**).

[00105] Quatro recombinantes AAV foram embalados em capsídeos de serótipo PHP.eB por métodos padrão. Três construções de promotor, LAP1 (498 bp, correspondente a SEQ ID Nº: 1), LAP2 (404 bp, correspondente a SEQ ID Nº: 2) e LAP1_2 (880 bp, correspondente a SEQ ID Nº: 3), foram preparadas. O promotor EF-1α ubíquo (1264 pb) foi usado como um controle positivo para a expressão do transgene. Todos os quatro AAV recombinantes expressaram o mCherry repórter fluorescente (**Figura 1B**). Para verificar o desempenho *in vitro* de cada promotor, culturas neuronais de gânglios cervicais superiores primários (SCG) de rato foram transduzidas com 3 x 10^{11} genomas de cada AAV, e a intensidade relativa de fluorescência (RFI) de mCherry foi quantificada ao longo de um período de 90 dias.

[00106] Para neurônios transduzidos com AAV-LAP1, a expressão de mCherry aumentou abruptamente em 11 dpi (64220 RFI), mas para um nível mais baixo quando comparado com AAV-LAP2, AAV-LAP1_2 e AAV-EF1α. A expressão de AAV-EF1α aumentou ~ 120 vezes mais em 17 dpi (8,70 x 106; 2,39 x 106; 8,01 x 106 RFI respectivamente) (**Figura 1C**). O nível mais alto de expressão por todos os quatro recombinantes foi em 28 dpi: LAP1 (291.242 RFI); LAP2 (1,36 x10^{7} RFI); LAP1_2 (4,36 x 10^{6} RFI) e EF1α (1,40 x 10^{7} RFI) (**Figuras 1C** e **1D**). LAP2 e EF1 α tiveram o maior RFI de mCherry (LAP2 = EF1α> LAP1_2> LAP1). Entre 38 dpi e 90 dpi, todos os quatro AAV recombinantes mostraram uma diminuição sutil, mas sustentada de RFI (**Figura 1C**), provavelmente devido à senescência de neurônios SCG primários após mais de 100 dias em cultura. É

importante ressaltar que todos os três recombinantes AAV-LAP mostraram transcrição de mCherry em neurônios primários por 90 dias no contexto da transdução de AAV e na ausência de infecção de PRV.

Exemplo 3. O rastreamento de todo o SNC revela a expressão do transgene AAV-LAP pan-neuronal após seis meses.

[00107] O sorotipo AAV PHP.eB foi usado para um ensaio de rastreamento de promotor dada a capacidade realçada de cruzar a BBB e transduzir SNC de camundongos C57/BL6 após a liberação intravascular sistêmica (Chan, Jang *et al*. 2017). AAV-LAP1-mCherry, AAV-LAP2-mCherry, AAV-LAP1_2-mCherry e AAV-EF1α-mCherry foram liberados por injeção unilateral no seio retro-orbital venoso de 4×10^{11} genomas virais/camundongo (vg/camundongo). Conforme ilustrado na Figura **2A**, os cérebros e medula espinhal foram colhidos 30 dias e 190 dias após a transdução de AAV para quantificar a transcrição e translação de mCherry. A expressão de LAP-mCherry em todo o cérebro intacto foi determinada depois que os tecidos foram limpos, imunomanchados com iDISCO+ (imagem tridimensional habilitada para imunomarcação de órgãos limpos com solvente) e analisada por microscopia de luz folha e registro volumétrico (Renier, Wu *et al*. 2014; Renier, Adams *et al*. 2016).

[00108] Conforme demonstrado nas **Figuras 2B-2P**, todos os quatro promotores mostraram expressão de mCherry estável em 30 dpi e 190 dpi. A densidade (número de células mCherry positivas por mm^3 de tecido cerebral) de LAP2 foi maior do que as de LAP1 e LAP1_2 e não foi significativamente diferente da de EF1α em diferentes áreas do cérebro: córtex: motor primário, motor secundário, somatossensorial primário e somatossensorial suplementar, **Figuras 2B-2E**); formação de hipocampo (**Figura 2G**), pálido (**Figura 2I**), hipotálamo (**Figura 2K**) e áreas olfatórias (**Figura 2P**). No cerebelo,

LAP2 mostrou maior densidade de mCherry do que LAP1, LAP1_2 e EF1α (**Figura 2O**). Além disso, no corpo estriado (**Figura 2H**); tálamo (**Figura 2J**); mesencéfalo, áreas motoras e sensoriais (**Figuras 2L** e **2M**), e rombencéfalo (**Figura 2N**), LAP2 e LAP1_2 mostraram densidade significativamente maior do que EF1α ($p < 0,05$). Observe que a sequência de nucleotídeos LAP2 é 68% mais curta do que a de EF1α, mas supera EF1α em várias áreas do cérebro.

[00109] Para validar ainda mais a expressão do transgene LAP no SNC, a expressão da proteína mCherry foi avaliada por imuno-histoquímica (IHC) em seções sagitais do cérebro a 30 dpi e 190 dpi (**Figuras 3A-3H**). A análise de microscopia confocal mostrou manchamento de mCherry abundante em toda a área somatossensorial cortical (**Figura 3E**), o giro dentado na formação do hipocampo (**Figura 3F**), o caudoputame no estriado (**Figura 3G**) e o córtex cerebelar (**Figura 3H**) a 30 dpi. É importante ressaltar que a expressão de mCherry era estável para todas as três sequências de LAP em 190 dpi e era semelhante à do promotor AAV-EF1α-mCherry maior (**Figuras 3E-3H**, Painéis 5-8). Em seguida, a expressão de mCherry foi quantificada em 30 dpi e 190 dpi. O RFI de mCherry foi semelhante para todos os promotores AAV sem diferenças significativas (**Figuras 3I1-3I4**). O número de células mCherry positivas por pixel^2 após 190 dias foi subsequentemente quantificado. No córtex, o número de células que expressam LAP2 mCherry foi maior do que aqueles observados para LAP1-mCherry e LAP1_2-mCherry [LAP2: 297 ± 19,82 vs. LAP1:149 ± 5,61 vs LAP1_2: 168 ± 9,22 ($n = 6$, $p < 0,001$) (Figura 3J1). No giro dentado, estriado e cerebelo, o número de células positivas para mCherry foi semelhante para todas as variantes LAP e EF1α (**Figuras 3J2-3J4**). Assim, todas as variantes de AAV-LAP promovem a expressão de mCherry no cérebro, demonstrando ainda que uma única administração de AAV-

LAP recombinantes pode ser suficiente para conduzir a expressão de transgene pan-neuronal de longo prazo no SNC de camundongo.

Exemplo 4. A pequena variante do promotor de LAP2 conduz a expressão de transgene pan-neuronal forte e estável após administração sistêmica de AAV.

[00110] As eficácias da expressão de mCherry sob o controle de diferentes sequências de LAP de PRV foram comparadas. Sinal abundante no córtex (**Figuras 4A** e **4E1**), giro dentado (**Figuras 4B** e **4E2**), estriado (**Figuras 4C** e **4E3**) e cerebelo (**Figuras 4D** e **4E4**) em 30 dpi e 190 dpi foram observados. Além disso, o AAV-LAP2 RFI era estável e semelhante ao AAV-EF1α tanto em 30 dpi como em 190 dpi ($p < 0,05$) (**Figuras 4E1-4E4**; **Tabela 2**). Embora os níveis de AAV-LAP1 e AAV-LAP1_2 mCherry fossem estáveis e não significativamente diferentes entre eles em 30 dpi e 190 dpi no córtex, giro dentado, estriado e cerebelo (**Figuras 4E1-4E4**; **Tabela 2**), ambos os promotores mostraram significativamente menos expressão de transgene em comparação com LAP2 e EF1α.

Tabela 2. Expressão de mCherry no cérebro de camundongo com diferentes promotores de AAV-PHP.eB

Promoter	Região do cérebro	Expressão de mCherry direta		Expressão de mCherry de IHC indireta	
		30 dpi[a]	190 dpi	30 dpi	190 dpi
		(RFI)[b] Média ± SEM	(RFI) Média ± SEM	(RFI) Média ± SEM	(RFI) Média ± SEM
LAP1	Córtex	1,05 ± 0,12	1,35 ± 0,14	8,51 ± 0,47	8,46 ± 0,49
	Giro dentado	1,36 ± 0,11	0,99 ± 0,04	9,87 ± 0,72	9,00 ± 0,44
	Estriado	1,18 ± 0,13	1,41 ± 0,18	9,14 ± 0,97	9,17 ± 1,41
	Cerebelo	1,31 ± 0,17	1,48 ± 0,15	9,38 ± 0,92	9,75 ± 1,16
LAP2	Córtex	9,66 ± 0,41	9,39 ± 0,69	9,30 ± 0,70	10,18 ± 0,51
	Giro dentado	8,61 ± 0,63	9,32 ± 0,63	10,26 ± 0,52	10,01 ± 0,59
	Estriado	9,91 ± 0,51	10,61 ± 0,65	9,92 ± 0,57	11,06 ± 0,66
	Cerebelo	10,66 ± 0,67	10,34 ± 0,84	9,59 ± 0,50	10,26 ± 0,65
LAP1_2	Córtex	5,18 ± 0,43	5,36 ± 0,39	8,01 ± 0,61	8,70 ± 0,36
	Giro dentado	3,92 ± 0,70	4,17 ± 0,62	9,20 ± 0,64	10,02 ± 0,72
	Estriado	4,36 ± 0,84	4,67 ± 0,75	10,45 ± 0,48	10,17 ± 0,75
	Cerebelo	4,76 ± 0,54	5,42 ± 0,27	9,48 ± 0,56	9,86 ± 0,54
EF1α	Córtex	8,99 ± 0,62	9,05 ± 0,73	9,87 ± 0,77	10,16 ± 0,62
	Giro dentado	9,16 ± 0,57	9,16 ± 0,81	9,40 ± 0,72	9,45 ± 0,64
	Estriado	9,96 ± 0,59	10,93 ± 0,67	11,26 ± 0,61	10,29 ± 0,85
	Cerebelo	10,72 ± 0,49	11,06 ± 0,84	10,92 ± 0,66	10,65 ± 0,89

[a] dpi: dias após a injeção de AAV

[b]RFI: intensidade de fluorescência relativa

[00111] Uma vez que a meia-vida do mRNA é tipicamente mais curta do que a da proteína transladada (Chan, Mugler *et al*. 2018), fatias de cérebro de camundongo transduzidas com AAV-LAP foram medidas. O mRNA de AAV-LAP2-mCherry a 30 dpi (dados não mostrados) e 190 dpi foram medidos usando uma ribossonda específica de mCherry. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) mostrou RNA de AAV-LAP2 mCherry abundante no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo e bulbo olfatório (**Figuras 5A-5E**), confirmando ainda que LAP de PRV2 pode conduzir a transcrição transgênica crônica e robusta no SNC.

Exemplo 5. A expressão do transgene AAV-LAP no cérebro é predominante nos neurônios, mas não nas células gliais.

[00112] O tropismo e a especificidade da transdução de AAV e subsequente expressão do transgene dependem do sorotipo AAV (Aschauer, Kreuz *et al*. 2013, Bedbrook; Deverman *et al*. 2018) e do promotor (vonquieres, Frohlich *et al*. 2016; Hammond, Leek *et al*. al. 2017; Dayton, Grames *et al*. 2018). Para caracterizar quais tipos de células mostraram expressão de AAV-LAP-mCherry após liberação sistêmica de AAV-PHP.eB, coimunomarcações da proteína mCherry com marcadores para neurônios (NeuN), oligodencrócitos (Olig2), microglia (Iba1) e astrócitos (S100) foram realizados no córtex e giro dentado. A co-manchamento com NeuN e mCherry revelou que mais de 90% dos neurônios com imagem expressa mCherry impulsionada pelas diferentes variantes AAV-LAP no córtex e giro dentado (**Figuras 6A, 6B** e **6E**). Por outro lado, menos de 4% dos oligodendrócitos positivos para mCherry foram detectados para todas as variantes LAP (**Figuras 6C, 6D** e **6F**). Além disso, nenhuma comarcação de mCherry com marcadores de microglia e astrócitos para qualquer um dos recombinantes LAP foi observada (**Figuras 7A-7D**). No geral, esses resultados demonstram que, no contexto da transdução cerebral

sistêmica com AAV-PHP.eB, a expressão de LAP-mCherry é abundante em neurônios, mas não em células gliais.

Exemplo 6. As construções de AAV-LAP exibem uma expressão de transgene ampla, estável e de longo prazo em toda a medula espinhal.

[00113] Além do cérebro, o desempenho de AAV-LAP na medula espinhal, onde o sorotipo PHP.eB mostrou transdução generalizada de massa cinzenta (Chan, Jang *et al*. 2017; Dayton, Grames *et al*. 2018), foi avaliado.

[00114] Foi observada expressão abundante de mCherry nativa em ambos os cornos dorsal e ventral da medula espinhal nos níveis cervical, torácico (dados não mostrados) e lombar a 190 dpi (**Figuras 8A-8D**). A quantificação da fluorescência de mCherry nativa (RFI) para todos os promotores foi semelhante, sem diferenças estatisticamente significativas (**Figura 8E**). No entanto, os recombinantes LAP2 e LAP1_2 mostraram a maior densidade de células positivas para mCherry por pixel^2, seguidos por EF1α e LAP1; LAP2 = LAP1_2 > EF1α > LAP1 (**Figura** 8F). Portanto, todas as três sequências de LAP de PRV mediam eficazmente a expressão do transgene pan-neuronal de longo prazo na medula espinhal.

[00115] A terapia gênica tem sido usada para restaurar a função do gene em células alvo específicas em distúrbios neurológicos e neurodegenerativos (Deverman, Ravina *et al*. 2018). A transferência de genes por liberação de vetor sistêmico por meio de transdução vascular periférica pode ser difícil para a expressão eficiente de um modo específico de neurônio ou pan-neuronal no SNC (Ingusci, Verlengia *et al*. 2019). Os vetores AAV recombinantes estão entre os veículos mais eficientes para alcançar a expressão gênica no SNC (Hudry e Vandenberghe 2019, Wang, Tai *et al*. 2019). Além disso, os capsídeos de AAV projetados mostraram transdução do SNC realçada

e capacidade realçada para cruzar a BBB com maior eficiência do que os serótipos de ocorrência natural (Chan, Jang *et al*. 2017; Bedbrook, Deverman *et al*. 2018; Hordeaux, Yuan *et al*. 2019; Qin Huang e Alejandro B. Balazs 2019). Apesar desses avanços, a terapia gênica de AAV é prejudicada pelo pequeno limite de tamanho de carga útil de 4,9 Kb para o capsídeo de AAV (Chamberlain, Riyad *et al*. 2016). Por exemplo, as terapias do SNC para a doença de Pompe (Colella, Sellier *et al*. 2019) e a doença de Parkinson (Wang, Muramatsu *et al*. 2002) são baseadas na liberação de genes relativamente grandes, como GAA (2,9 Kb) e GDNF (2,5 Kb) . Para esses e outros casos semelhantes, o uso de promotores maiores ou mesmo promotores menores de CMV e hSyn mostrou ser rapidamente reprimido após o parto (Gray, Foti *et al*. 2011, Jackson, Dayton *et al*. 2016).

[00116] Conforme descrito neste documento, três pequenos promotores pan-neuronais isolados do genoma do alfa-herpesvírus PRV foram identificados, mostrando uma expressão de transgene eficiente e de longo prazo no SNC de camundongos após a liberação sistêmica de AAV PHP.eB. Os resultados apresentados aqui demonstram que essas pequenas sequências de LAP de PRV podem conduzir a expressão de longo prazo de um transgene repórter (> 6 meses) no cérebro e na medula espinhal. LAP de PRV transduziu neurônios uniformemente no córtex, estriado, giro dentado e cerebelo. A distribuição de células positivas para mCherry não foi significativamente diferente entre as sequências de LAP no giro dentado, estriado e cerebelo. No entanto, a expressão do transgene LAP2 foi significativamente maior no córtex em comparação com LAP1 e LAP1_2. O ensaio de rastreamento de cérebro inteiro demonstrou que a variante LAP2 de apenas 402 bp pode conduzir uma expressão de mCherry mais forte do que as sequências de LAP1 e LAP1_2 maiores. Além disso, o mRNA de mCherry abundante

transcrição de LAP2 foi detectado em cada região do cérebro rastreada em 190 dpi. Estes resultados demonstram tanto a transcrição quanto a translação eficiente conduzidas do pequeno LAP de PRV2 no SNC após liberação sistêmica de AAV-LAP2 na ausência de infecção por PRV.

[00117] Embora a densidade de células LAP1-mCherry fosse significativamente menor do que para LAP2, a expressão de mCherry permaneceu estável e de longa duração. Portanto, LAP1 pode ser útil nos casos em que pequenas quantidades da proteína terapêutica são necessárias (por exemplo, deficiências enzimáticas) ou para correção cruzada para células não transduzidas. Por exemplo, para a deficiência de enzima lisossomal (Husain, Passini *et al*. 2009) e doenças mucopolissacaridose VII (Cearley e Wolfe 2007), onde a enzima restaurada pela terapia por AAV pode ser secretada da célula transduzida e melhorar as células doentes vizinhas.

[00118] O tropismo de AAV é determinado principalmente por interações entre o capsídeo e receptores específicos em células suscetíveis e permissivas (Aschauer, Kreuz *et al*. 2013; Bedbrook, Deverman *et al*. 2018). Diferentes sorotipos de AAV têm diferentes tropismos de tecidos. No entanto, a sequência do promotor e outras sequências incluídas no vetor, como a sequência de repetição terminal invertida (ITR), podem ter um impacto substancial no tropismo (Haberman e McCown 2002). Além disso, a região do promotor que transcreve o transgene é criticamente importante para otimizar o desempenho do vetor AAV. A expressão eficiente do transgene de uma forma ampla ou específica do tipo celular, requer ligação e ação de TFs derivados de células à região do promotor (Dayton, Grames *et al*. 2018; Andersson e Sandelin 2019). Mudanças no ambiente neuronal, como envelhecimento ou diferenciação, também podem alterar o recrutamento de proteínas

reguladoras específicas de células e, portanto, a expressão gênica no SNC (Herdegen e Leah 1998). A análise da sequência LAP de PRV aqui apresentada identificou DPE em LAP2, que poderia controlar o início da expressão do transgene, duração e especificidade do tipo de célula. Além disso, quatro motivos STAT1, que em HSV-1 LAP parecem regular a reativação viral da latência (Kriesel, Jones *et al*. 2004), foram identificados. Surpreendentemente, um desses motivos STAT1 em LAP de PRV2 foi encontrado para colocalizar com a caixa TATA e um motivo Olig2, um conhecido TFs multifacetado que promove destinos neuronais e de oligodendrócitos (Emery e Lu 2015). Os efeitos de proximidade associados a esses motivos e ao sítio de partida da transcrição poderiam explicar os diferentes níveis de expressão do transgene do SNC entre LAP2, LAP1 e LAP1_2. Além disso, um motivo CTCF foi encontrado a jusante da caixa TATA de LAP2, que poderia ter um papel na resistência ao silenciamento epigenético durante a latência, conforme mostrado para HSV-1 (Lang, Li *et al*. 2017; Lee, Raja *et al*. 2018) Na verdade, Zimmerman e colegas (Zimmerman, Patel *et al*. 2018) descobriram que a inserção de um motivo CTCF a jusante do promotor EF1α aumentou a expressão do transgene significativamente em comparação com os promotores EF1α e CMV nativos. Curiosamente, a inserção de um motivo CTCF secundário a jusante da caixa TATA de CMV não teve efeito na expressão do repórter de luciferase, presumivelmente devido à presença redundante de um motivo CTCF nativo (Zimmerman, Patel *et al*. 2018). Consequentemente, a expressão do gene é suscetível a alterações dependendo do contexto genético e das proteínas de ligação ao DNA específicas da sequência. O recrutamento de TFs específicos de diferentes células hospedeiras pode modular a transcrição do transgene pelos mesmos mecanismos que regulam a

resistência à inativação durante a latência. Elementos isolantes como o fator de ligação a CTCF são regulados de forma independente (Washington, Musarrat *et al*. 2018) e podem proteger as regiões promotoras da repressão por heterocromatina, mantendo a transcrição de longa duração (Lang, Li *et al*. 2017).

[00119] A avaliação histológica da transdução específica da célula por colocalização de LAP-mCherry, marcadores gliais e neuronais, revelou que as sequências de LAP se expressam de forma mais eficiente nos neurônios do que na glia, no córtex e giro dentado. Células LAP-mCherry positivas colocalizadas predominantemente com marcadores específicos de neurônios e, em menor extensão, com oligodendrócitos, mas não com microglia ou astrócitos. Estas descobertas sugerem que as sequências de LAP de PRV têm um perfil promotor pan-neuronal no SNC após a liberação sistémica de PHP.eB. Esta atividade também foi encontrada para as sequências de LAP de HSV devido à presença de um motivo CRE a montante da caixa TATA (Leib, Nadeau *et al*. 1991; Kenny, Krebs *et al*. 1994; Bloom, Stevens *et al*. 1997). LAP de PRV1 e LAP2 são promotores específicos de neurônios na ausência de outras proteínas virais e que os níveis de expressão do transgene variam entre os diferentes tipos de neurônios (Taharaguchi, Yoshino *et al*. 2003). É importante ressaltar que AAV-PHP.eB transduz neurônios predominantemente (Chan, Jang *et al*. 2017), e a combinação desta variante do capsídeo com sequências de LAP de PRV exibe um perfil de expressão pan-neuronal forte e de longa duração no SNC. Assim, as sequências de LAP de PRV podem ser usadas não apenas no contexto de vetores virais recombinantes (AAV, adenovírus, lentivírus, herpesvírus), mas também com plataformas de liberação de genes não virais. O hospedeiro natural do PRV é o suíno adulto, mas o vírus tem um tropismo extremamente amplo e pode infectar alguns pássaros,

peixes e muitos tipos de mamíferos, incluindo alguns primatas (Baskerville e Lloyd 1977). Além disso, as células humanas em cultura são suscetíveis à infecção por PRV e houve alguns relatos de infecções zoonóticas (Wong, Lu *et al*. 2019). Portanto, a sequência LAP de PRV pode ser otimizada para aplicações de terapia gênica que requerem expressão de transgene eficiente e de longo prazo em vários mamíferos diferentes, incluindo humanos.

[00120] Em resumo, os dados aqui apresentados demonstraram que a atividade do promotor LAP de PRV é independente da infecção por PRV e que pequenas sequências AAV-PHP.eB-LAP expressam transgenes de forma estável e pan-neuronal no cérebro e na medula espinhal (CNS). A transcrição e translação do transgene de longo prazo é fundamental para aplicações de terapia gênica de dose única eficazes e duradouras. Assim, as sequências de LAP de PRV podem ser úteis para o tratamento de doenças genéticas do SNC.

Exemplo 7. As sequências de LAP conduzem de forma eficiente a expressão do transgene em células e tecidos não neuronais.

[00121] Nos exemplos a seguir, as sequências de LAP foram demonstradas para conduzir com eficiência a expressão do transgene de uma proteína repórter fluorescente (mCherry) em vários tipos de células e tecidos, incluindo rim, fígado e retina. Além disso, descobriu-se que o LAP é compatível com vetores virais (como AAV), bem como com vetores não virais (como a transfecção direta de DNA de plasmídeo).

[00122] Conforme mostrado nas **Figuras 9A-9C**, as sequências de LAP conduzem a expressão eficiente do transgene em células renais de suínos. Imagens representativas de células PK15 (células epiteliais de rim suíno, ATCC CCL-33) foram obtidas 48 horas após a transfecção de um plasmídeo repórter compreendendo mCherry conduzido por LAP1 (**Figura 9A**), LAP2 (**Figura 9B**) ou LAP1_2 (**Figura 9C**).

[00123] Como mostrado nas **Figuras 10A** e **10B**, LAP2 conduz a expressão de transgene eficiente em células renais humanas. Imagens representativas de células HEK-293 (células epiteliais de rim embrionário humano, ATCC CRL-1573) foram obtidas 48 horas após a transfecção de um plasmídeo repórter compreendendo mCherry conduzido por LAP2 (**Figura 10A**) ou o promotor EF1α (**Figuras 10B**).

[00124] Conforme mostrado nas **Figuras 11A** e **11B**, LAP2 conduz a expressão de transgene eficiente em células de fígado humano. Imagens representativas de células HepG2 (células epiteliais de fígado humano, ATCC HB-8065) foram obtidas 48 horas após a transfecção de um plasmídeo repórter compreendendo mCherry conduzido por LAP2 (**Figura 11A**) ou o promotor EF1α (**Figura 11B**).

[00125] Como mostrado nas **Figuras 12A1-12B4**, LAP2 conduz a expressão do transgene de longo prazo em todo o fígado. As administrações intravenosas do AAV-LAP2 (**Figuras 12A1-12A4**) ou do vetor AAV-EF1α (**Figuras 12B1-12B4**) foram realizadas por injeções unilaterais nos seios retro-orbitais de camundongo (4 x 10^{11}vg/camundongo). O fígado foi coletado a 190 dpi e seccionado longitudinalmente a 20 μm para posterior IHC e análise de microscopia confocal. Imagens confocais representativas mostradas fluorescência de mCherry ativa (**Figuras 12A1** e **12B1**: vermelho), imunomarcação anti-mCherry (**Figuras 12A2** e **12B2**: verde), contramanchamento nuclear de DAPI (**Figuras 12A3** e **12B3**: azul) e imunofluorescência mesclada e imagens de DAPI (**Figuras 12A4** e **12B4**).

[00126] Conforme mostrado nas **Figuras 13A1-13B4**, LAP2 conduz a expressão de transgene de longo prazo no rim de camundongo. As administrações intravenosas do AAV-LAP2 (**Figuras** 13A1-13A4) ou do vetor AAV-EF1α (**Figuras 13B1-13B4**) foram realizadas por injeções unilaterais nos seios retro-orbitais do

camundongo (4 x 10^{11}vg/camundongo). Os rins foram coletados a 190 dpi e seccionados longitudinalmente a 20 µm para posterior IHQ e análise de microscopia confocal. Imagens confocais representativas mostram fluorescência de mCherry nativa (**Figuras 13A1** e **13B1**: vermelho), imunomanchamento anti-mCherry (**Figuras 13A2** e **13B2**: verde), contramanchamento nuclear DAPI (**Figuras 13A3** e **13B3**: azul) e imunofluorescência mesclada e imagens de DAPI (**Figuras** 13A4 e 13B4).

[00127] Como mostrado nas **Figuras**14A1-14B4, LAP2 conduz a expressão do transgene de longo prazo na retina do camundongo. As administrações intravenosas do AAV-LAP2 (**Figuras** 14A1-14A4) ou do vetor AAV-EF1α (**Figuras** 14B1-14B4) foram realizadas por injeções unilaterais nos seios retro-orbitais do camundongo (4 x 10^{11}vg/camundongo). As retinas foram coletadas em 190 dpi e criosseccionadas transversalmente a 20 µm para subsequente análise de IHC e microscopia confocal. Imagens confocais representativas mostram fluorescência de mCherry nativa (**Figuras 14A1** e **14B1**: vermelho), imunomanchamento anti-mCherry (**Figuras 14A2** e **14B2**: verde), contramanchamento nuclear DAPI (**Figuras 14A3** e **14B3**: azul) e imunofluorescência mesclada e imagens de DAPI (**Figuras 14A4** e **14B4**).

Referências

Andersson, R. and A. Sandelin (2019). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. Nat Rev Genet.

Aschauer, D. F., S. Kreuz and S. Rumpel (2013). Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. PLoS One 8(9): e76310.

Back, S., A. Dossat, I. Parkkinen, P. Koivula, M. Airavaara,

C. T. Richie, Y. H. Chen, Y. Wang and B. K. Harvey (2019). Neuronal Activation Stimulates Cytomegalovirus Promoter-Driven Transgene Expression. Mol Ther Methods Clin Dev 14: 180-188.

Baskerville, A. and G. Lloyd (1977). Experimental infection of monkeys with Herpesvirus suis (Aujeszky's-disease virus). J Med Microbiol 10(1): 139-144.

Bedbrook, C. N., B. E. Deverman and V. Gradinaru (2018). Viral Strategies for Targeting the Central and Peripheral Nervous Systems. Annu Rev Neurosci 41: 323-348.

Berges, B. K., J. H. Wolfe and N. W. Fraser (2007). Transduction of brain by herpes simplex virus vectors. Mol Ther 15(1): 20-29.

Berthomme, H., J. Lokensgard, L. Yang, T. Margolis and L. T. Feldman (2000). Evidence for a bidirectional element located downstream from the herpes simplex virus type 1 latency-associated promoter that increases its activity during latency. J Virol 74(8): 3613-3622.

Blanchard, Le Meur, Le Cunff, Blanchard, Leger, and Jestin (2006). Cellular gene expression survey of PseudoRabies Virus (PRV) infected Human Embryonic Kidney cells (HEK-293). Vet Res, 705-723.

Bloom, D. C., J. G. Stevens, J. M. Hill and R. K. Tran (1997). Mutagenesis of a cAMP response element within the latency-associated transcript promoter of HSV-1 reduces adrenergic reactivation. Virology 236(1): 202-207.

Boldogkoi, Erdelyi, and Fodor (2000). A putative latency promoter/enhancer (P(LAT2)) region of pseudorabies virus contains a virulence determinant. J Gen Virol, 415-420.

Brooks, A. R., R. N. Harkins, P. Wang, H. S. Qian, P. Liu and G. M. Rubanyi (2004). Transcriptional silencing is associated with

extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. J Gene Med 6(4): 395-404.

Cearley, C. N. and J. H. Wolfe (2007). A single injection of an adeno-associated virus vector into nuclei with divergent connections results in widespread vector distribution in the brain and global correction of a neurogenetic disease. J Neurosci 27(37): 9928-9940.

Chamberlain, K., J. M. Riyad and T. Weber (2016). Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. Hum Gene Ther Methods 27(1): 1-12.

Chan, K. Y., M. J. Jang, B. B. Yoo, A. Greenbaum, N. Ravi, W. L. Wu, L. Sanchez-Guardado, C. Lois, S. K. Mazmanian, B. E. Deverman and V. Gradinaru (2017). Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems. Nat Neurosci 20(8): 1172-1179.

Chan, L. Y., C. F. Mugler, S. Heinrich, P. Vallotton and K. Weis (2018). Non-invasive measurement of mRNA decay reveals translation initiation as the major determinant of mRNA stability. Elife 7.

Cheung, A. K. (1989). Detection of pseudorabies virus transcripts in trigeminal ganglia of latently infected swine. J Virol 63(7): 2908-2913.

Cheung, A. K. (1991). Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus. J Virol 65(10): 5260-5271.

Cheung, A. K. and T. A. Smith (1999). Analysis of the latency-associated transcript/UL1-3.5 gene cluster promoter complex of pseudorabies virus. Arch Virol 144(2): 381-391.

Chikhirzhina, Al'-Shekhadat, and Chikhirzhina (2008). Transcription factors of the nuclear factor 1 (NF1) family. Role in chromatin remodelation. Mol Biol (Mosk), 388-404.

Colella, P., P. Sellier, H. Costa Verdera, F. Puzzo, L. van

Wittenberghe, N. Guerchet, N. Daniele, B. Gjata, S. Marmier, S. Charles, M. Simon Sola, I. Ragone, C. Leborgne, F. Collaud and F. Mingozzi (2019). AAV Gene Transfer with Tandem Promoter Design Prevents Anti-transgene Immunity and Provides Persistent Efficacy in Neonate Pompe Mice. Mol Ther Methods Clin Dev 12: 85-101.

Curanovic, D., T. H. Ch'ng, M. Szpara and L. Enquist (2009). Compartmented neuron cultures for directional infection by alpha herpesviruses. Curr Protoc Cell Biol Chapter 26: Unit 26 24.

Dayton, R. D., M. S. Grames and R. L. Klein (2018). More expansive gene transfer to the rat CNS: AAV PHP.EB vector dose-response and comparison to AAV PHP.B. Gene Ther 25(5): 392-400.

Delzor, A., N. Dufour, F. Petit, M. Guillermier, D. Houitte, G. Auregan, E. Brouillet, P. Hantraye and N. Deglon (2012). Restricted transgene expression in the brain with cell-type specific neuronal promoters. Hum Gene Ther Methods 23(4): 242-254.

Deshmane, S. L. and N. W. Fraser (1989). During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. J Virol 63(2): 943-947.

Deverman, B. E., B. M. Ravina, K. S. Bankiewicz, S. M. Paul and D. W. Y. Sah (2018). Gene therapy for neurological disorders: progress and prospects. Nat Rev Drug Discov 17(10): 767.

Devi-Rao, G. B., S. A. Goodart, L. M. Hecht, R. Rochford, M. K. Rice and E. K. Wagner (1991). Relationship between polyadenylated and nonpolyadenylated herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts. J Virol 65(5): 2179-2190.

Emery, B. and Q. R. Lu (2015). Transcriptional and Epigenetic Regulation of Oligodendrocyte Development and Myelination in the Central Nervous System. Cold Spring Harb Perspect Biol 7(9): a020461.

Fan, Zhu, Sun, et al. (2019). Exploring the tissue tropism of

pseudorabies virus based on miRNA level analysis. BMC Microbiol, 125.

Fleming, Pavesi, Benatti, Imbriano, Mantovani, and Struhl (2013). NF-Y coassociates with FOS at promoters, enhancers, repetitive elements, and inactive chromatin regions, and is stereo-positioned with growth-controlling transcription factors. Genome Res, 1195-1209.

Gasparini, Llonch, Borsch, and Ader (2019). Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives. Prog Retin Eye Res, 1-37.

Gray, S. J., S. B. Foti, J. W. Schwartz, L. Bachaboina, B. Taylor-Blake, J. Coleman, M. D. Ehlers, M. J. Zylka, T. J. McCown and R. J. Samulski (2011). Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. Hum Gene Ther 22(9): 1143-1153.

Haberman, R. P. and T. J. McCown (2002). Regulation of gene expression in adeno-associated virus vectors in the brain. Methods 28(2): 219-226.

Hammond, S. L., A. N. Leek, E. H. Richman and R. B. Tjalkens (2017). Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. PLoS One 12(12): e0188830.

Herdegen, T. and J. D. Leah (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. Brain Res Brain Res Rev 28(3): 370-490.

Hordeaux, J., Y. Yuan, P. M. Clark, Q. Wang, R. A. Martino, J. J. Sims, P. Bell, A. Raymond, W. L. Stanford and J. M. Wilson (2019). The GPI-Linked Protein LY6A Drives AAV-PHP.B Transport

across the Blood-Brain Barrier. Mol Ther 27(5): 912-921.

Hudry, E. and L. H. Vandenberghe (2019). Therapeutic AAV Gene Transfer to the Nervous System: A Clinical Reality. Neuron 102(1): 263.

Husain, T., M. A. Passini, M. K. Parente, N. W. Fraser and J. H. Wolfe (2009). Long-term AAV vector gene and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell promoters. Gene Ther 16(7): 927-932.

Ingusci, S., G. Verlengia, M. Soukupova, S. Zucchini and M. Simonato (2019). Gene Therapy Tools for Brain Diseases. Front Pharmacol 10: 724.

Jackson, K. L., R. D. Dayton, B. E. Deverman and R. L. Klein (2016). Better Targeting, Better Efficiency for Wide-Scale Neuronal Transduction with the Synapsin Promoter and AAV-PHP.B. Front Mol Neurosci 9: 116.

Jin, L. and G. Scherba (1999). Expression of the pseudorabies virus latency-associated transcript gene during productive infection of cultured cells. J Virol 73(12): 9781-9788.

Jin, L., W. M. Schnitzlein and G. Scherba (2000). Identification of the pseudorabies virus promoter required for latency-associated transcript gene expression in the natural host. J Virol 74(14): 6333-6338.

Kenny, J. J., F. C. Krebs, H. T. Hartle, A. E. Gartner, B. Chatton, J. M. Leiden, J. P. Hoeffler, P. C. Weber and B. Wigdahl (1994). Identification of a second ATF/CREB-like element in the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) latency-associated transcript (LAT) promoter. Virology 200(1): 220-235.

Koyuncu, O. O., I. B. Hogue and L. W. Enquist (2013). Virus infections in the nervous system. Cell Host Microbe 13(4): 379-393.

Kriesel, J. D., B. B. Jones, K. M. Dahms and S. L. Spruance

(2004). STAT1 binds to the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter. J Neurovirol 10(1): 12-20.

Lang, F., X. Li, O. Vladimirova, B. Hu, G. Chen, Y. Xiao, V. Singh, D. Lu, L. Li, H. Han, J. M. Wickramasinghe, S. T. Smith, C. Zheng, Q. Li, P. M. Lieberman, N. W. Fraser and J. Zhou (2017). CTCF interacts with the lytic HSV-1 genome to promote viral transcription. Sci Rep 7: 39861.

Lee, J. S., P. Raja, D. Pan, J. M. Pesola, D. M. Coen and D. M. Knipe (2018). CCCTC-Binding Factor Acts as a Heterochromatin Barrier on Herpes Simplex Viral Latent Chromatin and Contributes to Poised Latent Infection. MBio 9(1).

Leib, D. A., C. L. Bogard, M. Kosz-Vnenchak, K. A. Hicks, D. M. Coen, D. M. Knipe and P. A. Schaffer (1989). A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. J Virol 63(7): 2893-2900.

Leib, D. A., K. C. Nadeau, S. A. Rundle and P. A. Schaffer (1991). The promoter of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 contains a functional cAMP-response element: role of the latency-associated transcripts and cAMP in reactivation of viral latency. Proc Natl Acad Sci U S A 88(1): 48-52.

Lokensgard, J. R., H. Berthomme and L. T. Feldman (1997). The latency-associated promoter of herpes simplex virus type 1 requires a region downstream of the transcription start site for long-term expression during latency. J Virol 71(9): 6714-6719.

Mahjoub, N., S. Dhorne-Pollet, W. Fuchs, M. L. Endale Ahanda, E. Lange, B. Klupp, A. Arya, J. E. Loveland, F. Lefevre, T. C. Mettenleiter and E. Giuffra (2015). A 2.5-kilobase deletion containing a cluster of nine microRNAs in the latency-associated-transcript locus of the pseudorabies virus affects the host response of porcine trigeminal

ganglia during established latency. J Virol 89(1): 428-442.

Mak, K. Y., I. G. Rajapaksha, P. W. Angus and C. B. Herath (2017). The Adeno-associated Virus - A Safe and Promising Vehicle for Liverspecific Gene Therapy of Inherited and Non-inherited Disorders. Curr Gene Ther 17(1): 4-16.

Maturana, C. J., A. Aguirre and J. C. Saez (2017). High glucocorticoid levels during gestation activate the inflammasome in hippocampal oligodendrocytes of the offspring. Dev Neurobiol 77(5): 625-642.

Nathanson, J. L., R. Jappelli, E. D. Scheeff, G. Manning, K. Obata, S. Brenner and E. M. Callaway (2009). Short Promoters in Viral Vectors Drive Selective Expression in Mammalian Inhibitory Neurons, but do not Restrict Activity to Specific Inhibitory Cell-Types. Front Neural Circuits 3: 19.

Nguyen, N. T. T., B. Contreras-Moreira, J. A. Castro-Mondragon, W. Santana-Garcia, R. Ossio, C. D. Robles-Espinoza, M. Bahin, S. Collombet, P. Vincens, D. Thieffry, J. van Helden, A. Medina-Rivera and M. Thomas-Chollier (2018). RSAT 2018: regulatory sequence analysis tools 20th anniversary. Nucleic Acids Res 46(W1): W209-W214.

Ogden, P. J., E. D. Kelsic, S. Sinai and G. M. Church (2019). Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. Science 366(6469): 1139-1143.

Ono, E., Y. Tomioka and S. Taharaguchi (2007). Possible roles of transcription factors of pseudorabies virus in neuropathogenicity. Fukuoka Igaku Zasshi 98(10): 364-372.

Peel, A. L., S. Zolotukhin, G. W. Schrimsher, N. Muzyczka and P. J. Reier (1997). Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors

containing cell type-specific promoters. Gene Ther 4(1): 16-24.

Pomeranz, Reynolds, and Hengartner (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. Microbiol Mol Biol Rev, 462-500.

Powell, S. K., R. Rivera-Soto and S. J. Gray (2015). Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. Discov Med 19(102): 49-57.

Priola, S. A. and J. G. Stevens (1991). The 5' and 3' limits of transcription in the pseudorabies virus latency associated transcription unit. Virology 182(2): 852-856.

Qin Huang, K. Y. C., Isabelle G. Tobey, Yujia Alina Chan,Tim Poterba, Christine L. Boutros, and R. D. Alejandro B. Balazs, Jonathan M. Bloom, Cotton Seed, Benjamin E. Deverman (2019). Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. Biorxiv.

Qin, J. Y., L. Zhang, K. L. Clift, I. Hulur, A. P. Xiang, B. Z. Ren and B. T. Lahn (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. PLoS One 5(5): e10611.

Renier, N., E. L. Adams, C. Kirst, Z. Wu, R. Azevedo, J. Kohl, A. E. Autry, L. Kadiri, K. Umadevi Venkataraju, Y. Zhou, V. X. Wang, C. Y. Tang, O. Olsen, C. Dulac, P. Osten and M. Tessier-Lavigne (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell 165(7): 1789-1802.

Renier, N., Z. Wu, D. J. Simon, J. Yang, P. Ariel and M. Tessier-Lavigne (2014). iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell 159(4): 896-910.

Russell, D. W. and R. K. Hirata (1998). Human gene targeting by viral vectors. Nat Genet 18(4): 325-330.

Samulski, R. J. and N. Muzyczka (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Annu Rev Virol 1(1): 427-451.

Sandelin, A., W. Alkema, P. Engstrom, W. W. Wasserman and B. Lenhard (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res 32(Database issue): D91-94.

Sohal, V. S., F. Zhang, O. Yizhar and K. Deisseroth (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. Nature 459(7247): 698-702.

Taharaguchi, S., T. Kobayashi, S. Yoshino and E. Ono (2002). Analysis of regulatory functions for the region located upstream from the latency-associated transcript (LAT) promoter of pseudorabies virus in cultured cells. Vet Microbiol 85(3): 197-208.

Taharaguchi, S., S. Yoshino, K. Amagai and E. Ono (2003). The latency-associated transcript promoter of pseudorabies virus directs neuron-specific expression in trigeminal ganglia of transgenic mice. J Gen Virol 84(Pt 8): 2015-2022.

von Jonquieres, G., D. Frohlich, C. B. Klugmann, X. Wen, A. E. Harasta, R. Ramkumar, Z. H. Spencer, G. D. Housley and M. Klugmann (2016). Recombinant Human Myelin-Associated Glycoprotein Promoter Drives Selective AAV-Mediated Transgene Expression in Oligodendrocytes. Front Mol Neurosci 9: 13.

Wang, D., P. W. L. Tai and G. Gao (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov 18(5): 358-378.

Wang, J., S. U. Pol, A. K. Haberman, C. Wang, M. A. O'Bara and F. J. Sim (2014). Transcription factor induction of human oligodendrocyte progenitor fate and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 111(28): E2885-2894.

Wang, L., S. Muramatsu, Y. Lu, K. Ikeguchi, K. Fujimoto, T. Okada, H. Mizukami, Y. Hanazono, A. Kume, F. Urano, H. Ichinose, T. Nagatsu, I. Nakano and K. Ozawa (2002). Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. Gene Ther 9(6): 381-389.

Washington, S. D., F. Musarrat, M. K. Ertel, G. L. Backes and D. M. Neumann (2018). CTCF Binding Sites in the Herpes Simplex Virus 1 Genome Display Site-Specific CTCF Occupation, Protein Recruitment, and Insulator Function. J Virol 92(8).

Wasserman, W. W. and A. Sandelin (2004). Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. Nat Rev Genet 5(4): 276-287.

Wong, G., J. Lu, W. Zhang and G. F. Gao (2019). Pseudorabies virus: a neglected zoonotic pathogen in humans? Emerg Microbes Infect 8(1): 150-154.

Yardeni, T., M. Eckhaus, H. D. Morris, M. Huizing and S. Hoogstraten-Miller (2011). Retro-orbital injections in mice. Lab Anim (NY) 40(5): 155-160.

Ziebarth, J. D., A. Bhattacharya and Y. Cui (2013). CTCFBSDB 2.0: a database for CTCF-binding sites and genome organization. Nucleic Acids Res 41(Database issue): D188-194.

Zimmerman, D., K. Patel, M. Hall and J. Elmer (2018). Enhancement of transgene expression by nuclear transcription factor Y and CCCTC-binding factor. Biotechnol Prog 34(6): 1581-1588.

Zolotukhin, S., B. J. Byrne, E. Mason, I. Zolotukhin, M. Potter, K. Chesnut, C. Summerford, R. J. Samulski and N. Muzyczka (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. Gene Therapy 6(6): 973-985.

[00128] Os ensinamentos de todas as patentes, pedidos publicados e referências citadas neste documento são incorporados por referência em sua totalidade.

[00129] Embora formas de realização de exemplo tenham sido particularmente mostradas e descritas, será entendido por aqueles versados na técnica que várias mudanças na forma e detalhes podem ser feitas nas mesmas, sem se afastar do escopo das formas de realização abrangidas pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Vetor recombinante para expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que compreende:

um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4;

um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e

pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

2. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor viral.

3. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor de vírus adenoassociado (AAV).

4. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor não viral.

5. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

6. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas.

7. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal de um indivíduo.

8. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside em uma área

motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação hipocampal, estriado, pálido, tálamo, hipotálamo, uma área do mesencéfalo, cérebro posterior, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo.

9. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada ao motor, uma área relacionada aos sentidos ou ambas.

10. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo.

11. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio, uma célula da micróglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos.

12. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio.

13. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo.

14. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal.

15. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

16. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula do osso, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula intestinal, uma célula de rim, uma célula de fígado, uma célula de pulmão, uma célula de músculo, uma célula pancreática, uma célula de retina, uma célula sexual, uma célula de pele, uma célula de baço, uma célula tronco e uma combinação das mesmas.

17. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

18. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

19. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento realçador.

20. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento indutor.

21. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que ainda compreende um elemento marcador selecionável.

22. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 21.

23. Molécula de polinucleotídeo recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

24. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

25. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

26. Molécula de polinucleotídeo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, caracterizada pelo fato de que o ácido nucleico que codifica o gene alvo compreende mais de 4 quilobases.

27. Molécula de polinucleotídeo recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende um ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade

de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

28. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

29. Molécula de polinucleotídeo recombinante, de acordo com a reivindicação 28, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

30. Método de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que compreende:

contatar a célula hospedeira com uma molécula polinucleotídica recombinante de modo que a molécula polinucleotídica recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula polinucleotídica recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo um ácido nucleico sequência com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4,

em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira.

31. Método, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3 e SEQ ID Nº: 4.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transdução ao entrar em contato com a célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato de que a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transfecção após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 34, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas.

37. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal de um indivíduo.

38. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside em uma área motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação de hipocampo, estriado, pálido,

tálamo, hipotálamo, um mesencéfalo área, posterior do cérebro, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada ao motor, uma área relacionada aos sentidos ou ambas.

40. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo.

41. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 40, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio, uma célula da microglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio.

43. Método, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo.

44. Método, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal.

45. Método, de acordo com a reivindicação 43 ou 44, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

46. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 30 a 35, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma

célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula do osso, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula intestinal, uma célula de rim, uma célula de fígado, uma célula de pulmão, uma célula de músculo, uma célula de pâncreas, uma célula de retina, uma célula sexual, uma célula de pele, uma célula de baço, uma célula tronco e uma combinação das mesmas.

47. Vetor recombinante para expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que compreende:

um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8;

um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e

pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

48. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor viral.

49. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor de vírus adenoassociado (AAV).

50. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 47, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor não viral.

51. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 50, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

52. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 51, caracterizado pelo fato de que a célula

hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas.

53. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 51, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal de um indivíduo.

54. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside em uma área motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação hipocampal, estriado, pálido, tálamo, hipotálamo, uma área do mesencéfalo, cérebro posterior, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo.

55. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada ao motor, uma área sensorial ou ambas.

56. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo.

57. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 56, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio, uma célula da micróglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos.

58. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio.

59. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo.

60. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 59,

caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal.

61. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 59 ou 60, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

62. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 51, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula do osso, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula intestinal, uma célula de rim, uma célula de fígado, uma célula de pulmão, uma célula de músculo, uma célula pancreática, uma célula de retina, uma célula sexual, uma célula de pele, uma célula de baço, uma célula tronco e uma combinação das mesmas.

63. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 62, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

64. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 63, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

65. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 64, caracterizado pelo fato de que pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento realçador.

66. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 65, caracterizado pelo fato de que pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento indutor.

67. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 66, caracterizado pelo fato de que ainda compreende um elemento marcador selecionável.

68. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 47 a 67.

69. Molécula de polinucleotídeo recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

70. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

71. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 70, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

72. Molécula de polinucleotídeo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 69 a 71, caracterizada pelo fato

de que o ácido nucleico que codifica o gene alvo compreende mais de 4 quilobases.

73. Molécula de polinucleotídeo recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, em que o sítio de clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende um ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

74. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 73, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

75. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 74, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

76. Método de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que compreende:

contatar a célula hospedeira com uma molécula polinucleotídica recombinante de modo que a molécula polinucleotídica recombinante seja introduzida na célula hospedeira, em que a molécula polinucleotídica recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo um ácido nucleico sequência com pelo menos 70% de identidade de

sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8,

em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira.

77. Método, de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

78. Método, de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas.

79. Método, de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal de um indivíduo.

80. Método, de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que é desejado pelo fato de que uma célula neuronal reside em uma área motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação de hipocampo, estriado, pálido, tálamo, hipotálamo, um mesencéfalo área, posterior do cérebro, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo.

81. Método, de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada ao motor, uma área relacionada aos sentidos ou ambas.

82. Método, de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo.

83. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 78 a 82, caracterizado pelo fato de que a célula

neuronal compreende um neurônio, uma célula da microglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos.

84. Método, de acordo com a reivindicação 83, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio.

85. Método, de acordo com a reivindicação 79, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo.

86. Método, de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal.

87. Método, de acordo com a reivindicação 85 ou 86, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

88. Método, de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula do osso, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula intestinal, uma célula do rim, uma célula do fígado, uma célula do pulmão, uma célula do músculo, uma célula do pâncreas, uma célula da retina, uma célula do sexo, uma célula da pele, uma célula do baço, uma célula tronco e uma combinação dos mesmos.

89. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 76 a 88, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

90. Método, de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7 e SEQ ID Nº: 8.

91. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 76 a 90, caracterizado pelo fato de que a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transdução ao entrar em contato com a célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

92. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 76 a 90, caracterizado pelo fato de que a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transfecção após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

93. Vetor recombinante para expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que compreende:

um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9;

um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e

pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

94. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor viral.

95. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 94, caracterizado pelo fato de que o vetor viral é um vetor de vírus adenoassociado (AAV).

96. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 93, caracterizado pelo fato de que o vetor é um vetor não viral.

97. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 96, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

98. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 97, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas.

99. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 97, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal de um indivíduo.

100. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside em uma área motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação hipocampal, estriado, pálido, tálamo, hipotálamo, uma área do mesencéfalo, cérebro posterior, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo.

101. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada ao motor, uma área relacionada aos sentidos ou ambas.

102. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no córtex, giro dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo.

103. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 98 a 102, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio, uma célula da micróglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos.

104. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação

103, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio.

105. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 99, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo.

106. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 105, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal.

107. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 105 ou 106, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

108. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 97, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula óssea, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula intestinal, uma célula de rim, uma célula de fígado, uma célula de pulmão, uma célula de músculo, uma célula pancreática, uma célula de retina, uma célula sexual, uma célula de pele, uma célula de baço, uma célula tronco e uma combinação das mesmas.

109. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 108, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 9.

110. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 109, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9.

111. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 110, caracterizado pelo fato de que o promotor ainda compreende uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas.

112. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 108, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nºs: 13-58.

113. Vetor recombinante, de acordo com a reivindicação 112, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nºs: 13-58.

114. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 113, caracterizado pelo fato de que pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento realçador.

115. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 114, caracterizado pelo fato de que pelo menos um elemento regulador não promotor compreende um elemento indutor.

116. Vetor recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 93 a 115, caracterizado pelo fato de que ainda compreende um elemento marcador selecionável.

117. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 93 a 116.

118. Molécula de polinucleotídeo recombinante, caracterizada pelo fato de que compreende um ácido nucleico que

codifica um gene alvo, em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9.

119. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 118, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 9.

120. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 119, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9.

121. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 118 a 120, caracterizada pelo fato de que o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas.

122. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 118, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nºs: 13-58.

123. Molécula de polinucleotídeo recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 118 a 122, caracterizada pelo fato de que o ácido nucleico que codifica o gene alvo compreende mais de 4 quilobases.

124. Molécula de polinucleotídeo recombinante que compreende um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica um gene alvo, caracterizada pelo fato de que o sítio de

clonagem está operacionalmente ligado a um promotor que compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9.

125. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 124, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 9.

126. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 125, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9.

127. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com qualquer uma das reivindicações 124 a 126, caracterizada pelo fato de que o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas.

128. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 124, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nºs: 13-58.

129. Molécula polinucleotídica recombinante, de acordo com a reivindicação 128, caracterizada pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID Nºs: 13-58.

130. Método de expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que compreende:

contatar a célula hospedeira com uma molécula de polinucleotídeo recombinante de modo que a molécula de polinucleotídeo recombinante seja introduzida na célula hospedeira,

em que a molécula de polinucleotídeo recombinante compreende um ácido nucleico que codifica o gene alvo e em que o ácido nucleico está operacionalmente ligado a um promotor compreendendo um ácido nucleico sequência com pelo menos 70% de identidade de sequência com a SEQ ID Nº: 9,

em que a expressão do gene alvo ocorre na célula hospedeira.

131. Método, de acordo com a reivindicação 130, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 9.

132. Método, de acordo com a reivindicação 131, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende a SEQ ID Nº: 9.

133. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 132, caracterizado pelo fato de que o promotor ainda compreende a sequência de ácido nucleico de SEQ ID Nº: 10, SEQ ID Nº: 11, SEQ ID Nº: 12 ou uma combinação das mesmas.

134. Método, de acordo com a reivindicação 130, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 90% de identidade de sequência com uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID NOs: 13-58.

135. Método, de acordo com a reivindicação 134, caracterizado pelo fato de que o promotor compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir de SEQ ID NOs: 13-58.

136. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 135, caracterizado pelo fato de que a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira

por transdução após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

137. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 135, caracterizado pelo fato de que a molécula de polinucleotídeo recombinante é introduzida na célula hospedeira por transfecção após o contato da célula hospedeira com o polinucleotídeo recombinante.

138. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 137, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é uma célula de mamífero.

139. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 138, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal *in vitro*, uma célula neuronal *ex vivo* ou ambas.

140. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 138, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira compreende uma célula neuronal de um indivíduo.

141. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside em uma área motora primária, uma área motora secundária, uma área somatossensorial primária, uma área somatossensorial suplementar, uma área visual, uma formação de hipocampo, estriado, pálido, tálamo, hipotálamo, um mesencéfalo área, posterior do cérebro, uma área olfativa ou uma combinação das mesmas, do indivíduo.

142. Método, de acordo com a reivindicação 141, caracterizado pelo fato de que a área do mesencéfalo compreende uma área relacionada ao motor, uma área relacionada aos sentidos ou ambas.

143. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no córtex, giro

dentado, estriado, cerebelo, bulbo olfatório ou uma combinação dos mesmos, do indivíduo.

144. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 140-143, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio, uma célula da microglia, um astrócito ou uma combinação dos mesmos.

145. Método, de acordo com a reivindicação 144, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal compreende um neurônio.

146. Método, de acordo com a reivindicação 140, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal do indivíduo.

147. Método, de acordo com a reivindicação 146, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside no corno dorsal da medula espinhal.

148. Método, de acordo com a reivindicação 146 ou 147, caracterizado pelo fato de que a célula neuronal reside na medula espinhal lombar, medula espinhal torácica, medula espinhal cervical ou uma combinação das mesmas.

149. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 130 a 138, caracterizado pelo fato de que a célula hospedeira é selecionada a partir do grupo que consiste em uma célula da bexiga, uma célula do sangue, uma célula do osso, uma célula endotelial, uma célula epitelial, uma célula de gordura, uma célula do coração, uma célula intestinal, uma célula de rim, uma célula de fígado, uma célula de pulmão, uma célula de músculo, uma célula de pâncreas, uma célula de retina, uma célula sexual, uma célula de pele, uma célula de baço, uma célula tronco e uma combinação das mesmas.

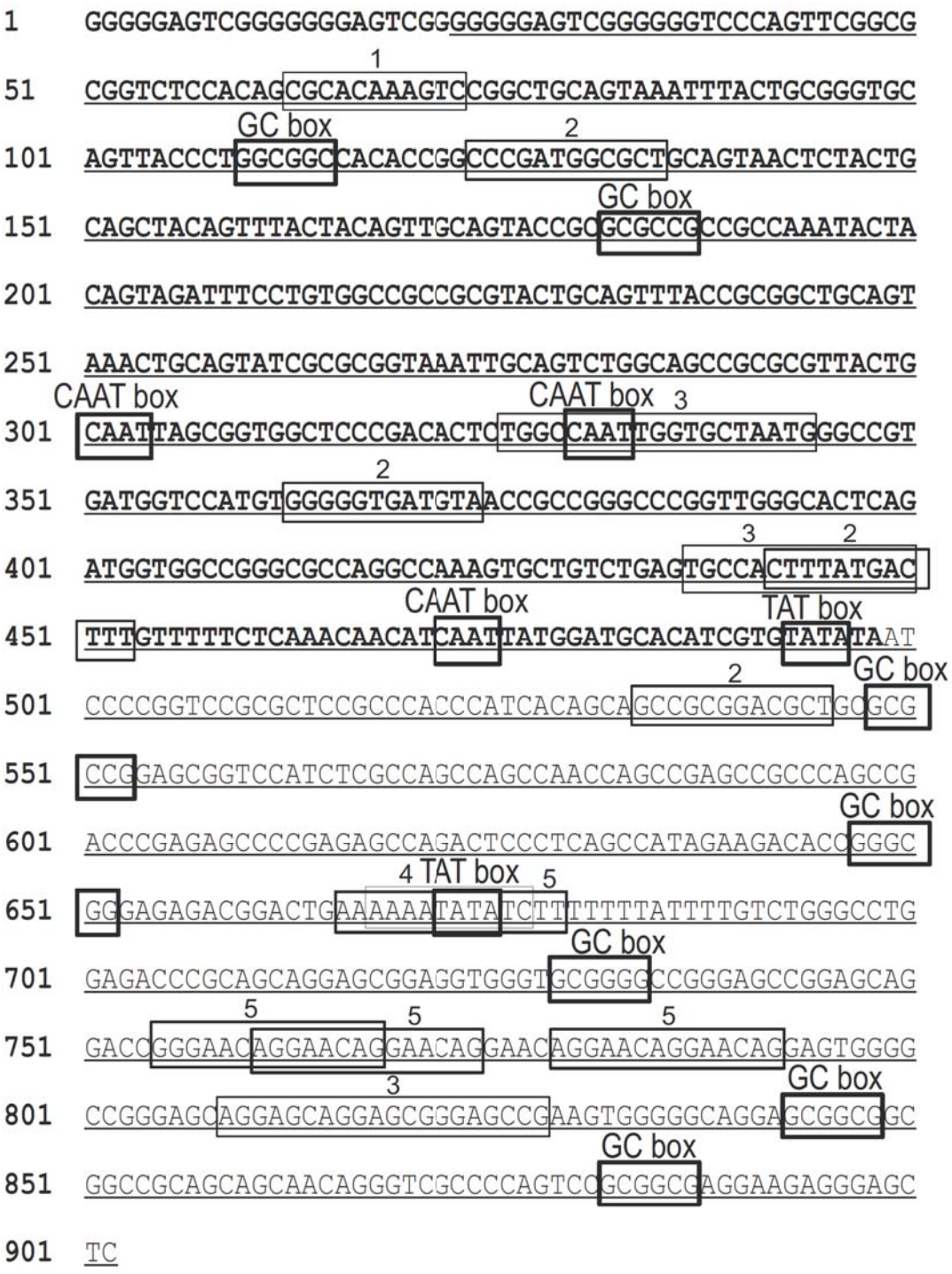

1 GGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGGAGTCGGGGGGGTCCCAGTTCGGCG
51 CGGTCTCCACAGCGCACAAAGTCCGGCTGCAGTAAATTTACTGCGGGTGC
101 AGTTACCCTGGCGGCCACACCGGCCCGATGGCGCTGCAGTAACTCTACTG
151 CAGCTACAGTTTACTACAGTTGCAGTACCGCGCGCCGCCGCCAAATACTA
201 CAGTAGATTTCCTGTGGCCGCCGCGTACTGCAGTTTACCGCGGCTGCAGT
251 AAACTGCAGTATCGCGCGGTAAATTGCAGTCTGGCAGCCGCGCGTTACTG
301 CAATTAGCGGTGGCTCCCGACACTCTGGCCAATTGGTGCTAATGGGCCGT
351 GATGGTCCATGTGGGGGGTGATGTAACCGCCGGGCCCGGTTGGGCACTCAG
401 ATGGTGGCCGGGCGCCAGGCCAAAGTGCTGTCTGAGTGCCACTTTATGAC
451 TTTGTTTTTCTCAAACAACATCAATTATGGATGCACATCGTGTATATAAT
501 CCCCGGTCCGCGCTCCGCCCACCCATCACAGCAGCCGCGGACGCTGCGCG
551 CCGGAGCGGTCCATCTCGCCAGCCAGCCAACCAGCCGAGCCGCCCAGCCG
601 ACCCGAGAGCCCCGAGAGCCAGACTCCCTCAGCCATAGAAGACACCGGGC
651 GGGAGAGACGGACTGAAAAAATATATCTTTTTTTATTTTGTCTGGGCCTG
701 GAGACCCGCAGCAGGAGCGGAGGTGGGTGCGGGGCCGGGAGCCGGAGCAG
751 GACCGGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAACAGGAGTGGGG
801 CCGGGAGCAGGAGCAGGAGCGGGAGCCGAAGTGGGGGCAGGAGCGGCGGC
851 GGCCGCAGCAGCAACAGGGTCGCCCCAGTCCGCGGCGAGGAAGAGGGAGC
901 TC
CAAT box
GC box
TAT box

FIG. 1A

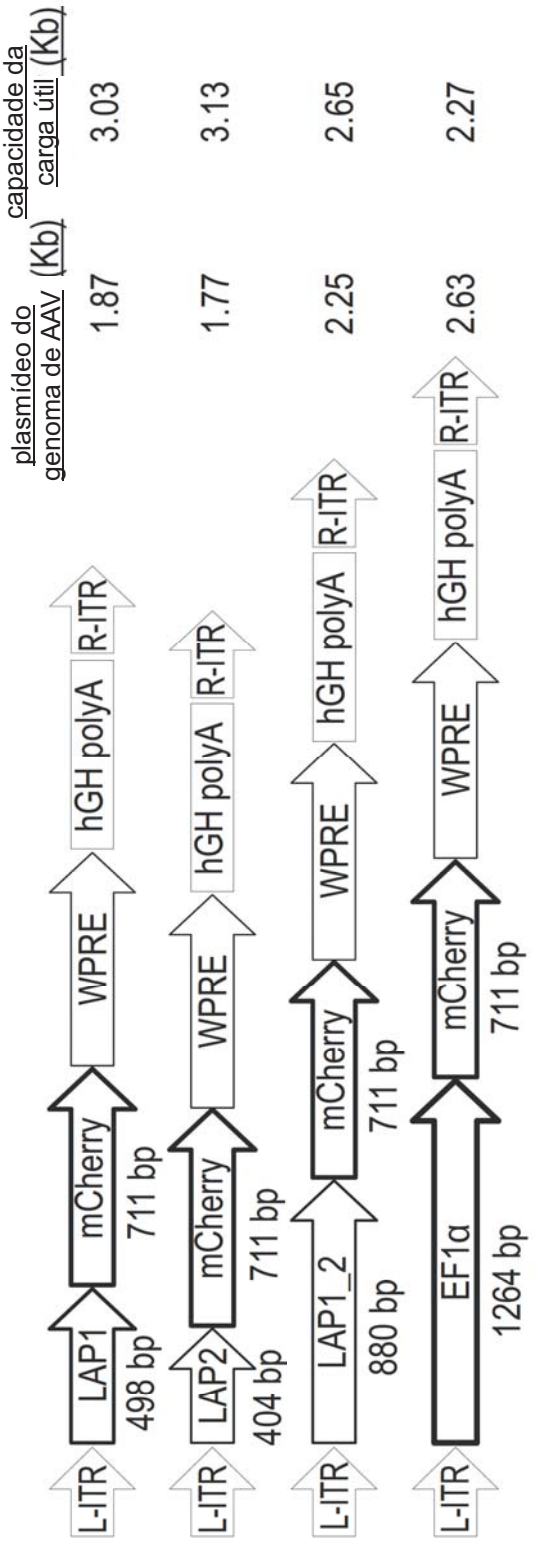

plasmídeo do genoma de AAV (Kb)
capacidade da carga útil (Kb)
L-ITR
LAP1
498 bp
mCherry
711 bp
WPRE
hGH polyA
R-ITR
1.87
3.03
L-ITR
LAP2
404 bp
mCherry
711 bp
WPRE
hGH polyA
R-ITR
1.77
3.13
L-ITR
LAP1_2
880 bp
mCherry
711 bp
WPRE
hGH polyA
R-ITR
2.25
2.65
L-ITR
EF1α
1264 bp
mCherry
711 bp
WPRE
hGH polyA
R-ITR
2.63
2.27

FIG. 1B

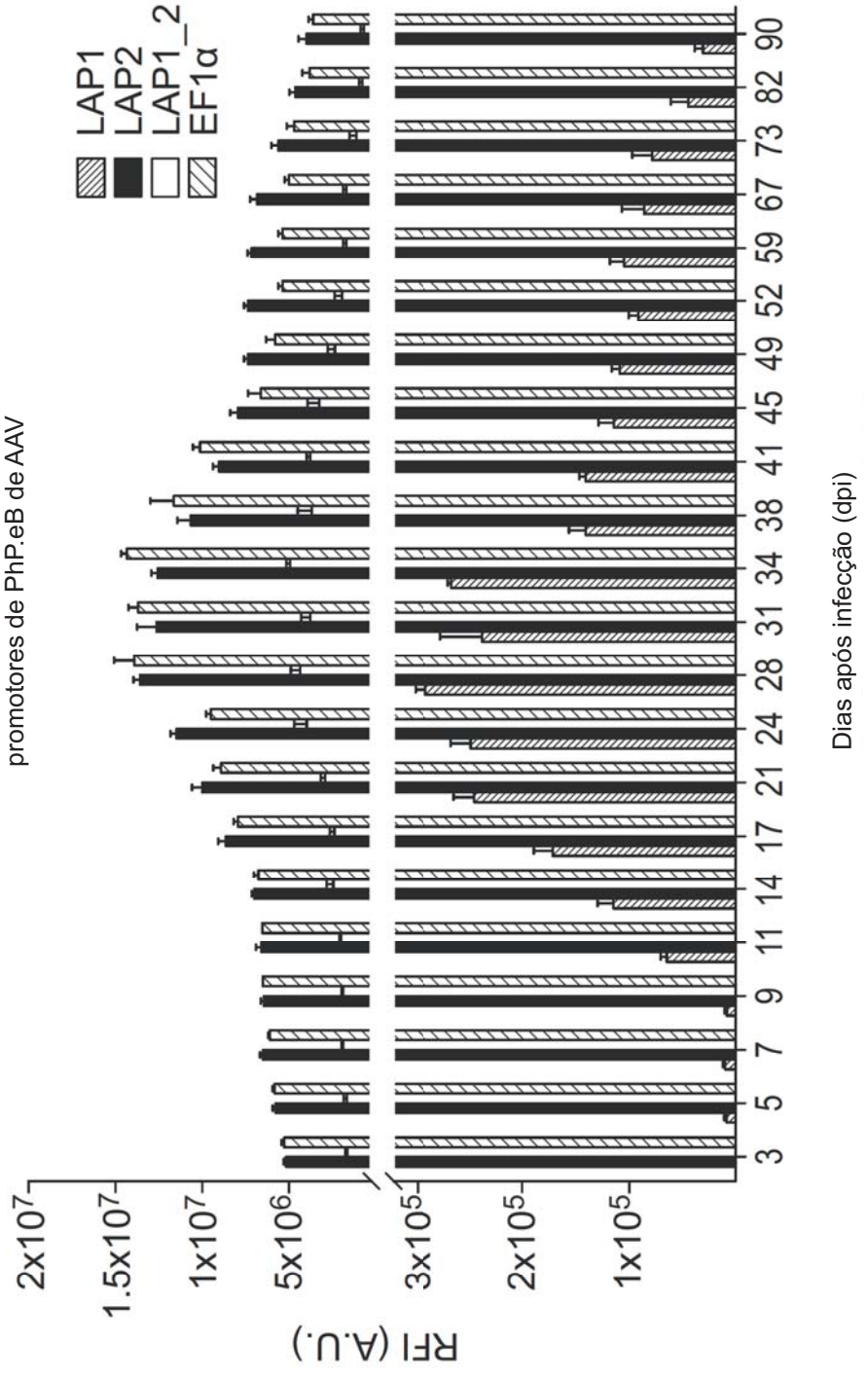

promotores de PhP.eB de AAV
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
RFI (A.U.)
2x10^7
1.5x10^7
1x10^7
5x10^6
3x10^5
2x10^5
1x10^5
3 5 7 9 11 14 17 21 24 28 31 34 38 41 45 49 52 59 67 73 82 90
Dias após infecção (dpi)

FIG. 1C

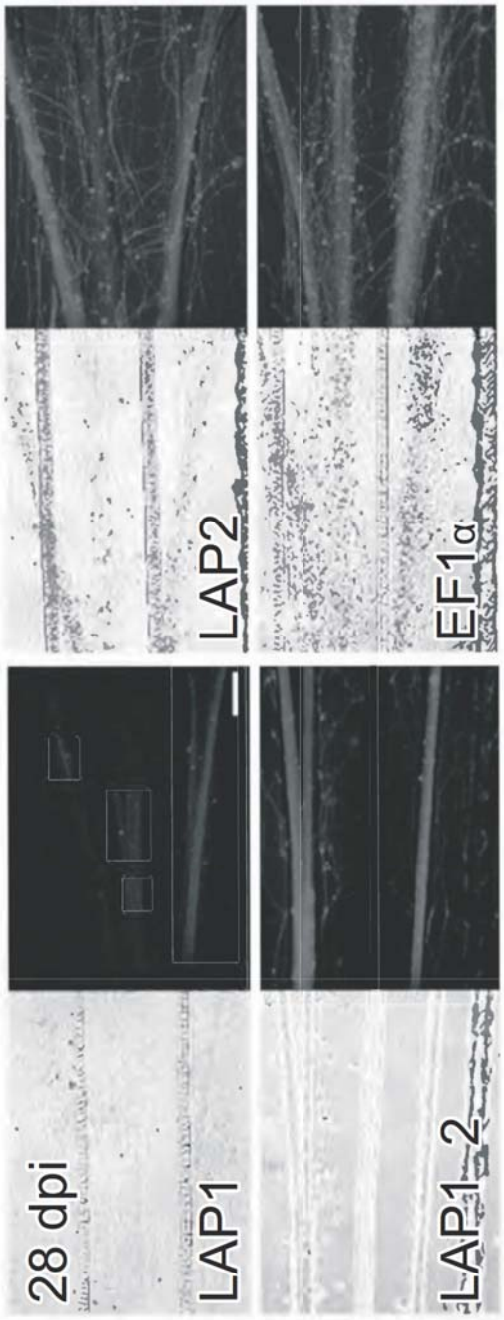


FIG. 1D

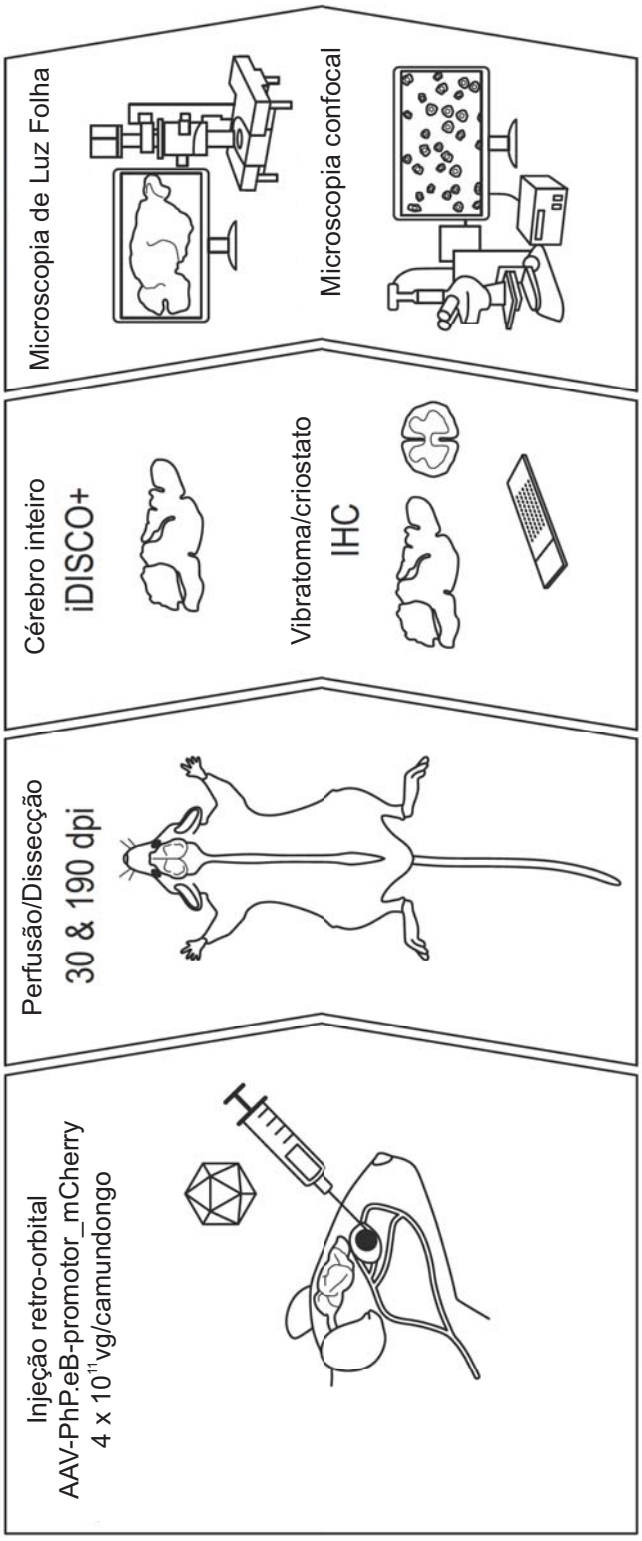

Injeção retro-orbital
AAV-PhP.eB-promotor_mCherry
4 x 10^11 vg/camundongo
Perfusão/Dissecção
30 & 190 dpi
Cérebro inteiro
iDISCO+
Vibratoma/criostato
IHC
Microscopia de Luz Folha
Microscopia confocal

FIG. 2A

FIG. 2B

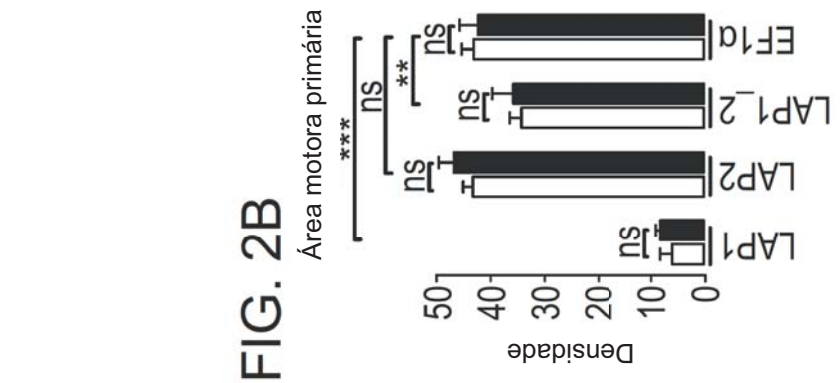


FIG. 2C

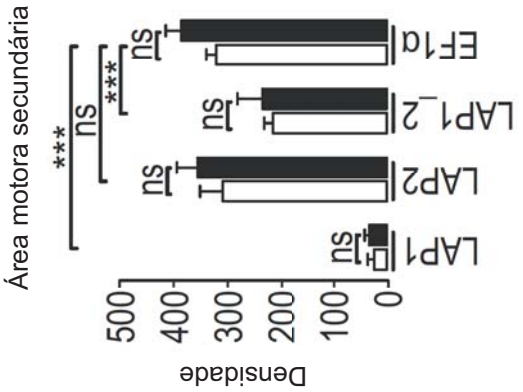


FIG. 2D

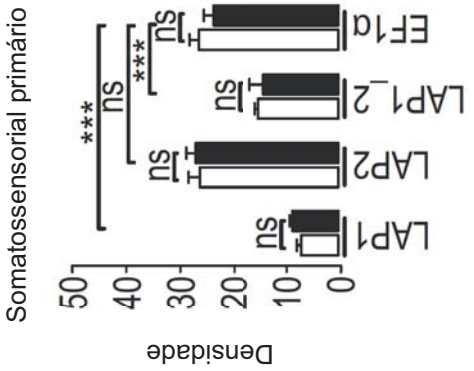


FIG. 2E

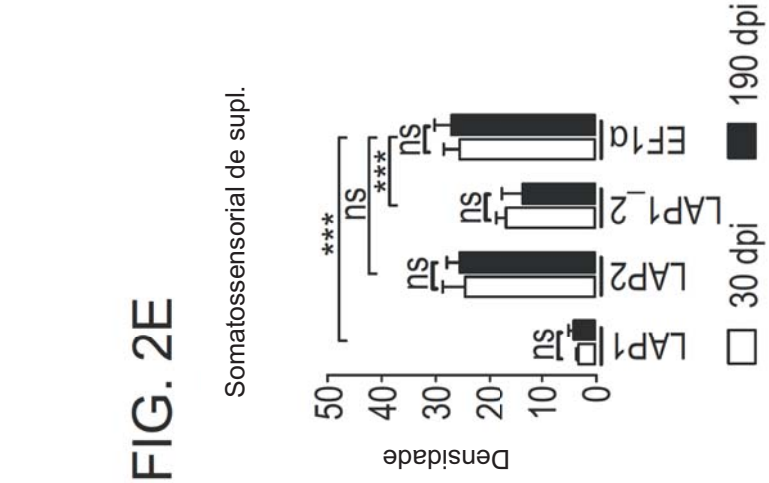


FIG. 2F

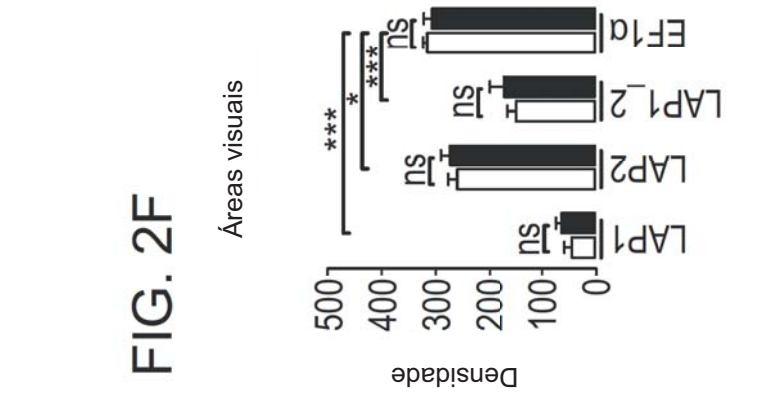


FIG. 2G

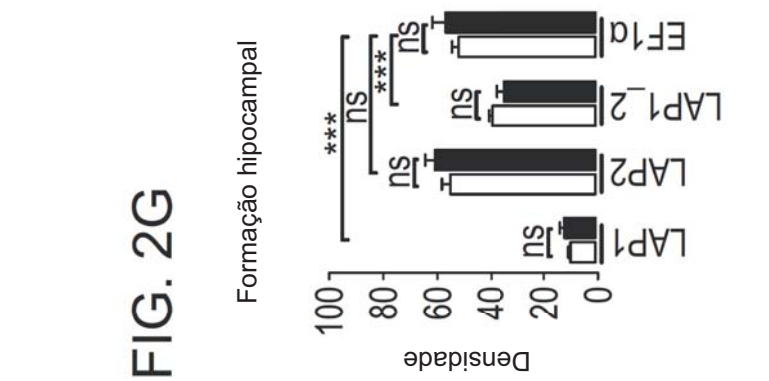


FIG. 2H

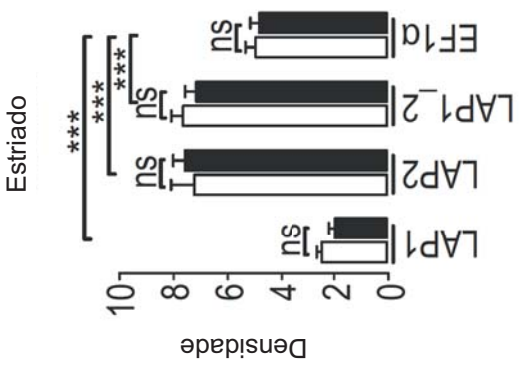


FIG. 2I

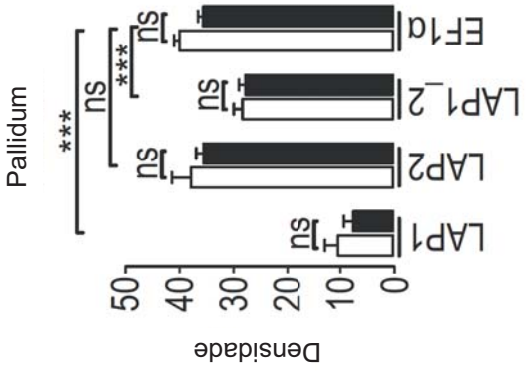


FIG. 2J

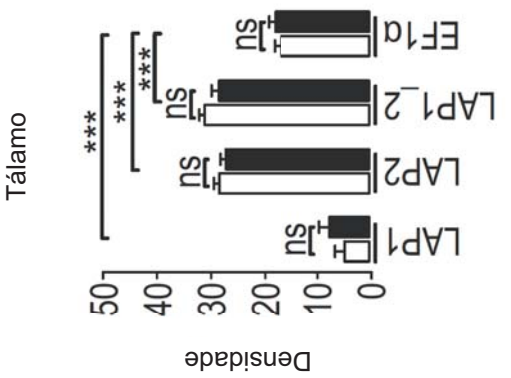


FIG. 2K

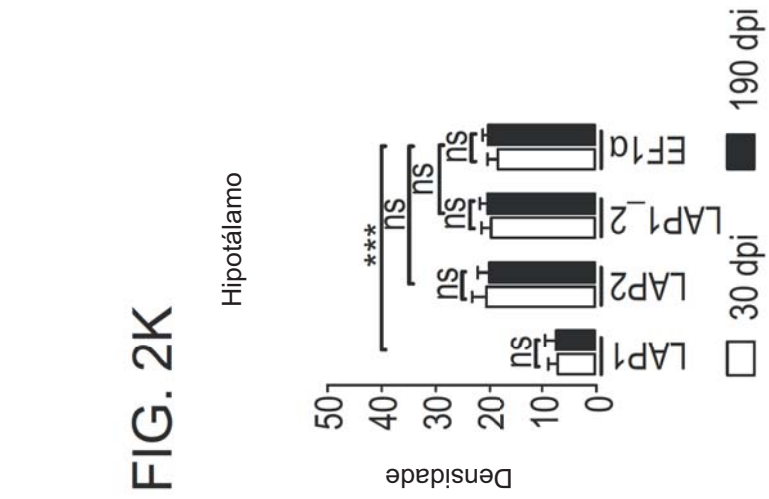


FIG. 2L

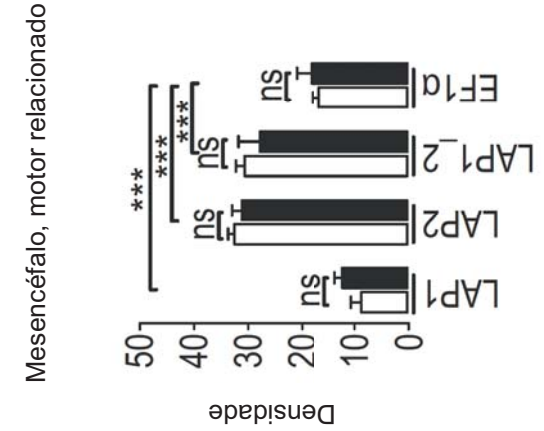


FIG. 2M

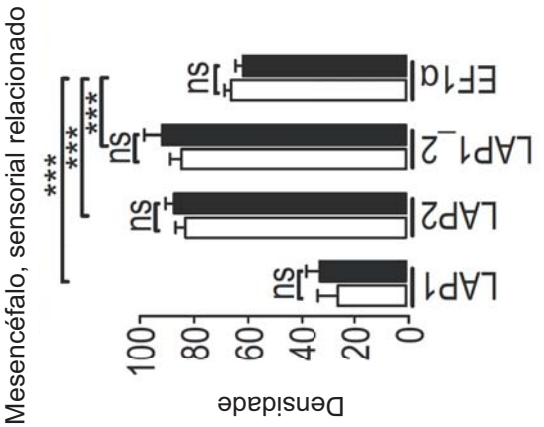


FIG. 2N

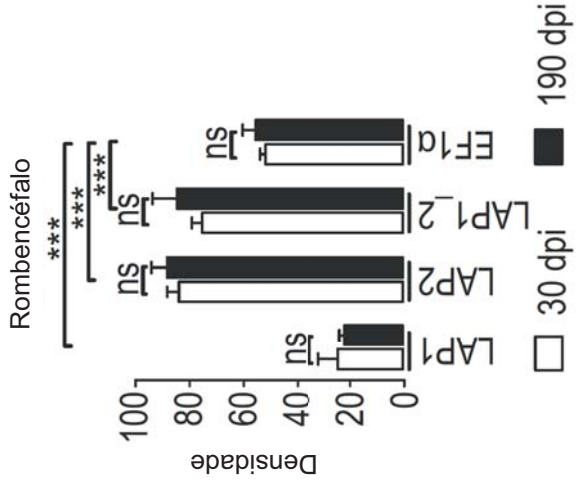


FIG. 2O

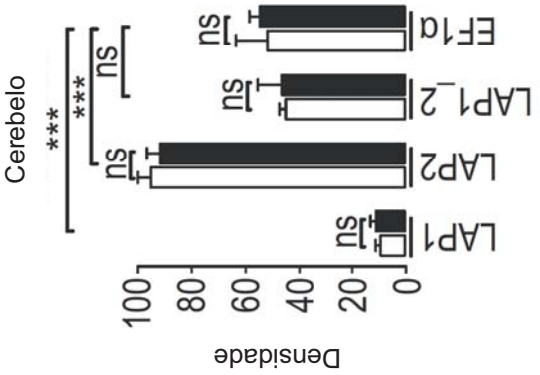


FIG. 2P

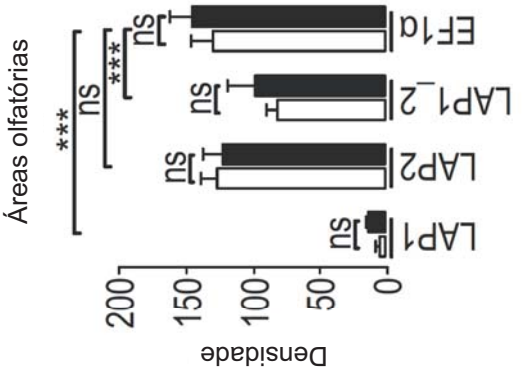


FIG. 3A



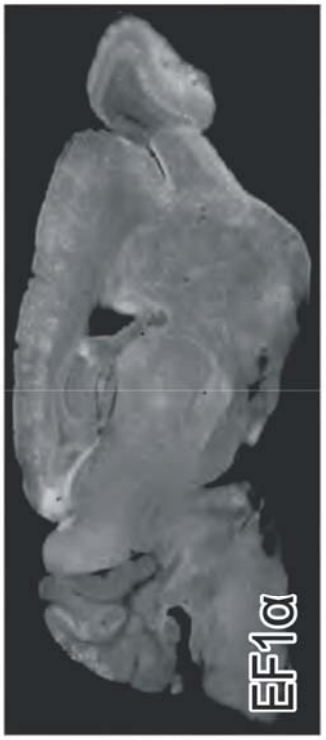
FIG. 3B



FIG. 3C



FIG. 3D



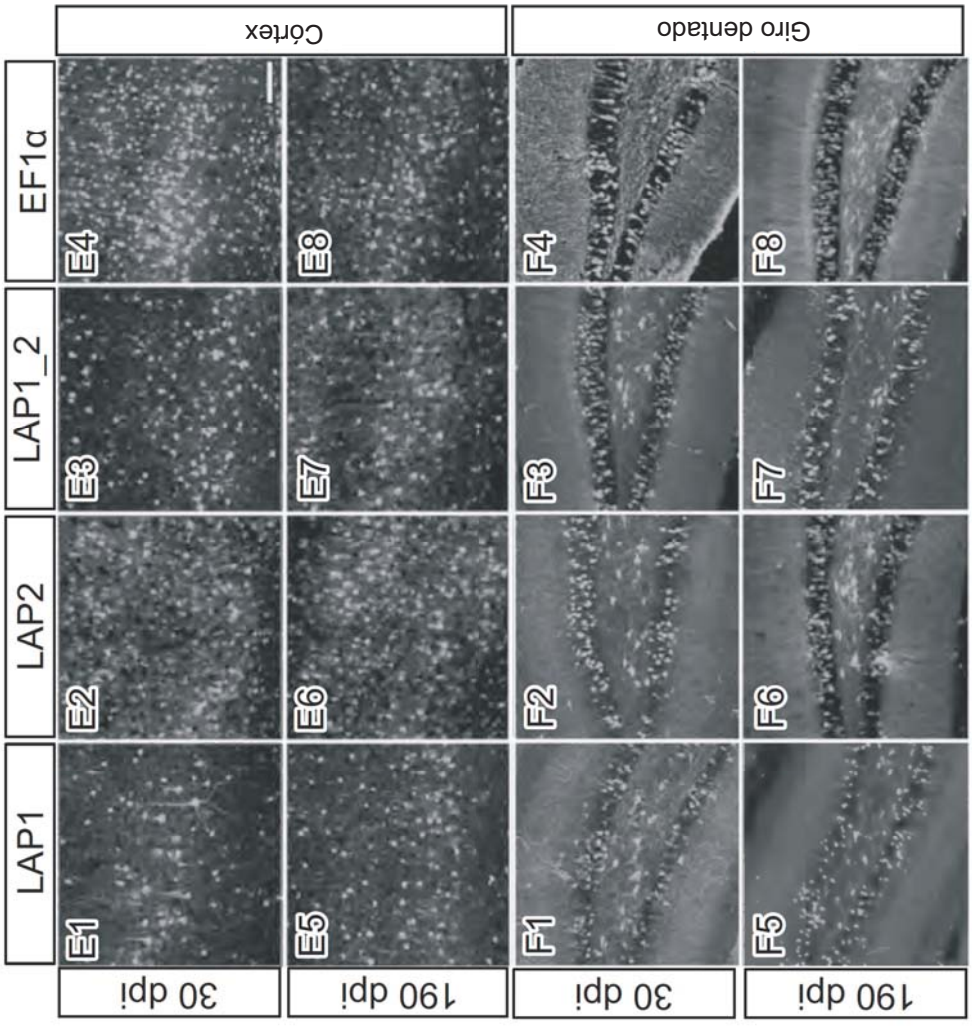

Córtex
Giro dentado
EF1α
LAP1_2
LAP2
LAP1
E4
E8
F4
F8
E3
E7
F3
F7
E2
E6
F2
F6
E1
E5
F1
F5
30 dpi
190 dpi
30 dpi
190 dpi

FIG. 3E

FIG. 3F

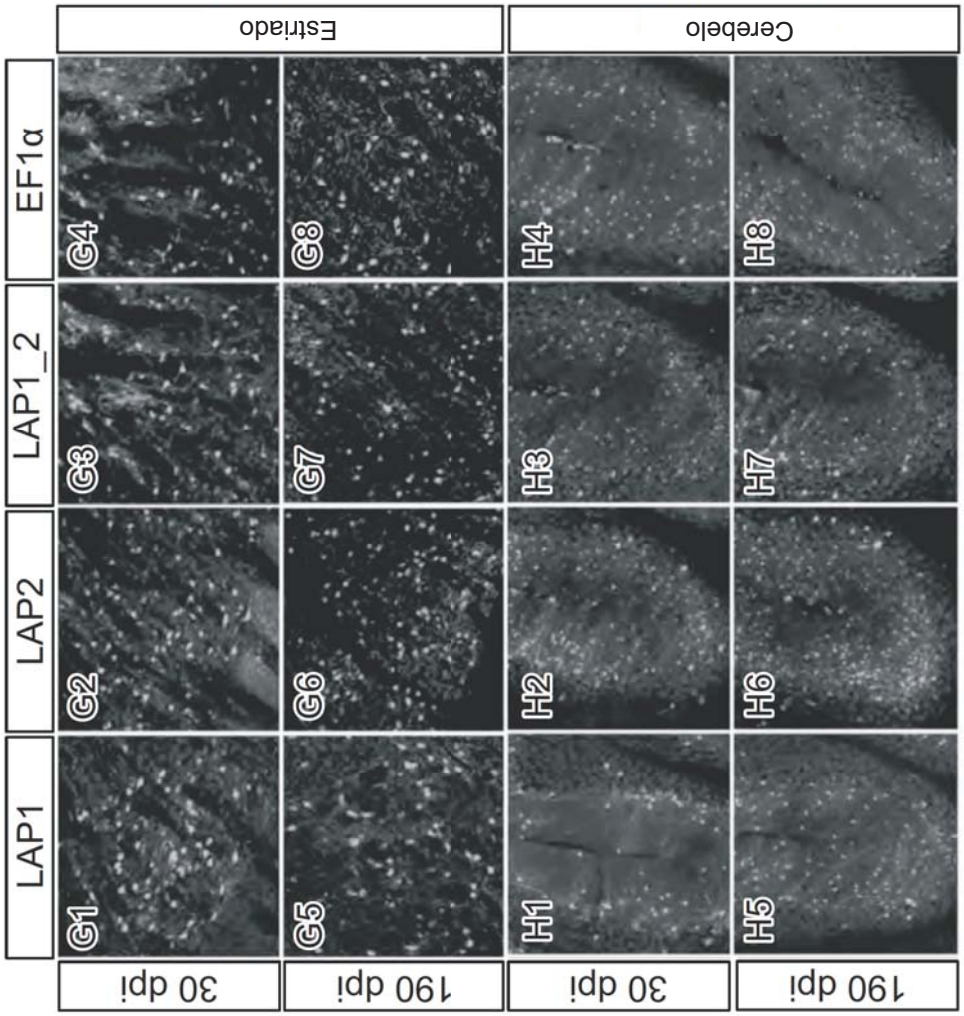

Estriado
Cerebelo
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
30 dpi
190 dpi
30 dpi
190 dpi
G1
G2
G3
G4
G5
G6
G7
G8
H1
H2
H3
H4
H5
H6
H7
H8

FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 3I1

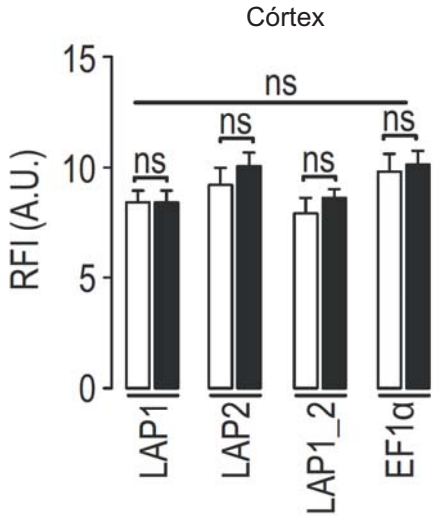


FIG. 3I2

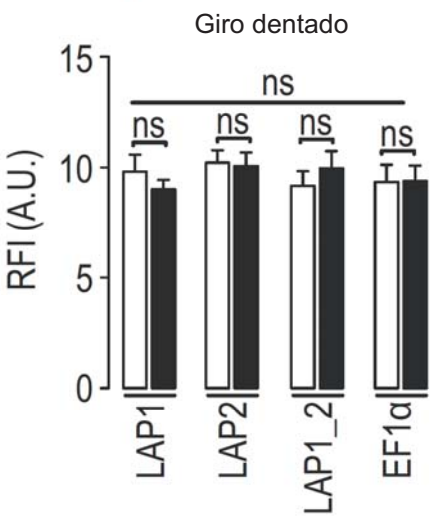


FIG. 3I3

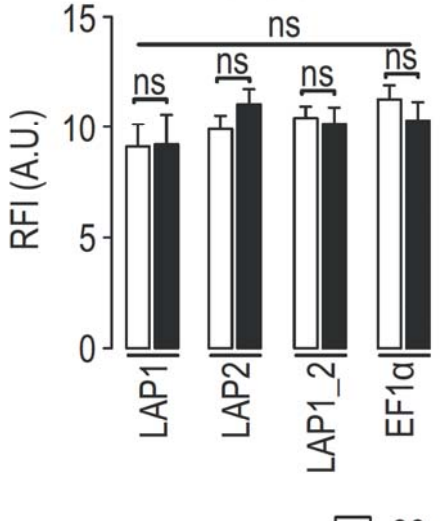


FIG. 3I4

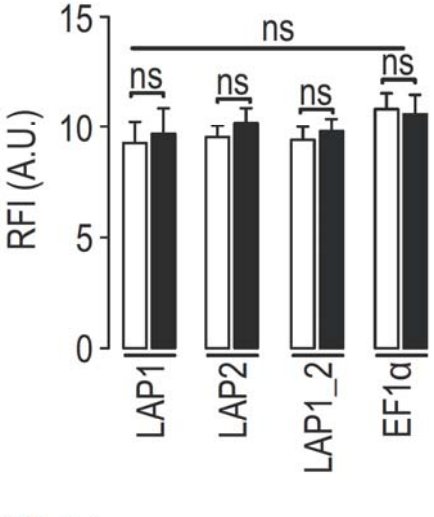




FIG. 3J1

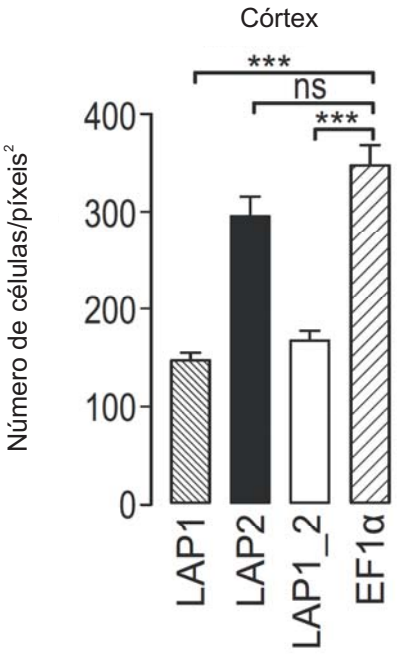


FIG. 3J2

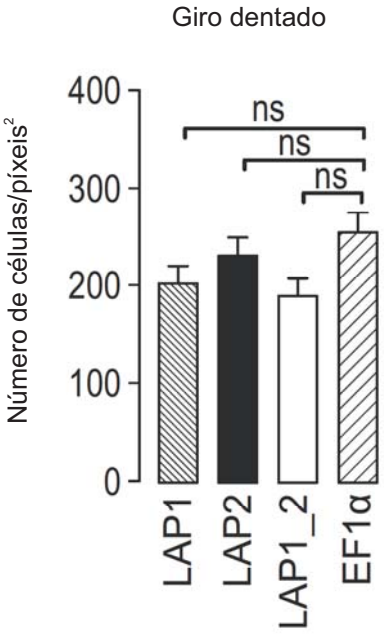


FIG. 3J3

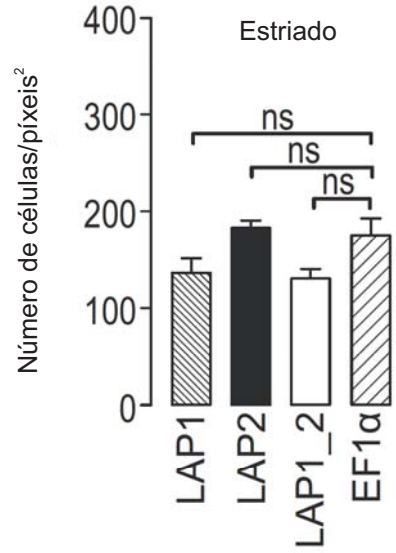
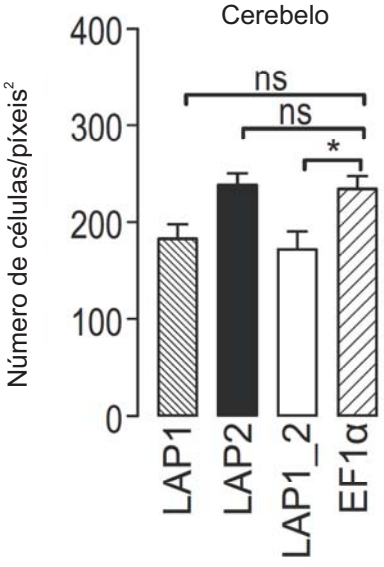


FIG. 3J4



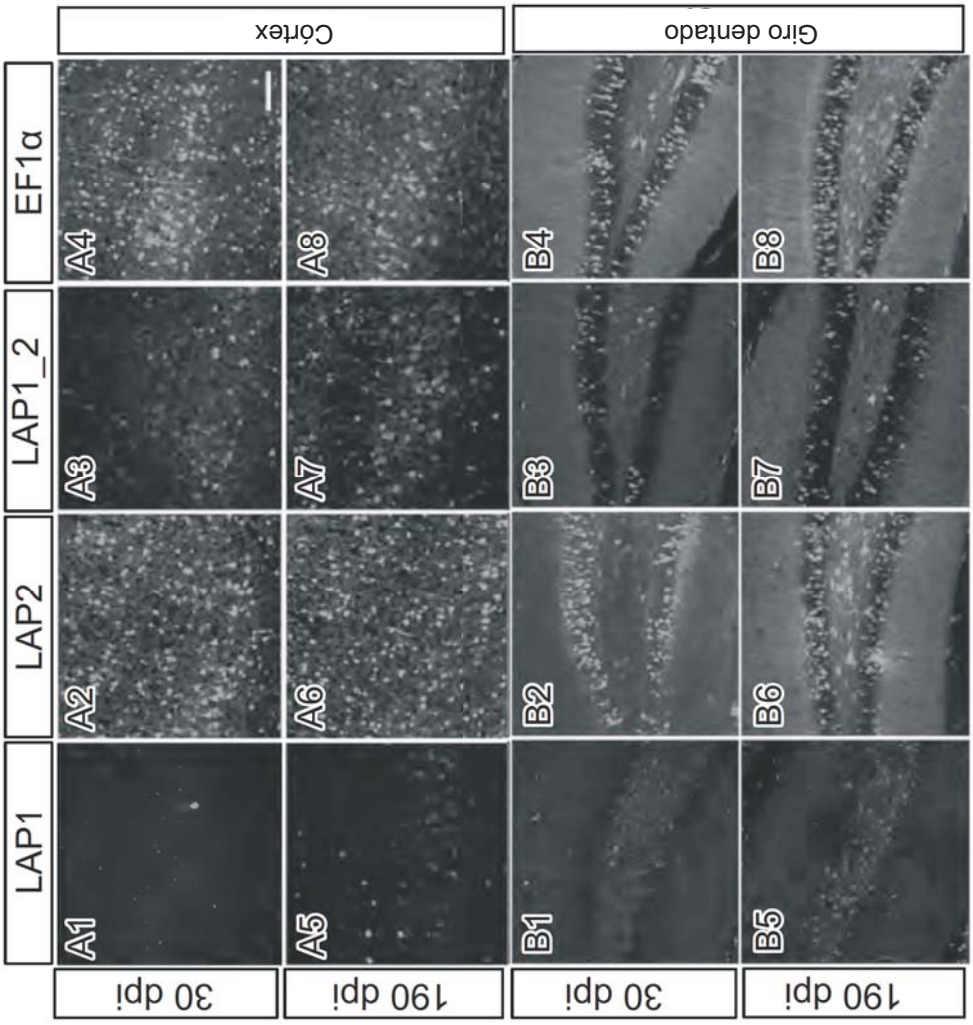

Córtex
Giro dentado
EF1α
LAP1_2
LAP2
LAP1
A4
A8
A3
A7
A2
A6
A1
A5
B4
B8
B3
B7
B2
B6
B1
B5
30 dpi
190 dpi
30 dpi
190 dpi

FIG. 4A

FIG. 4B

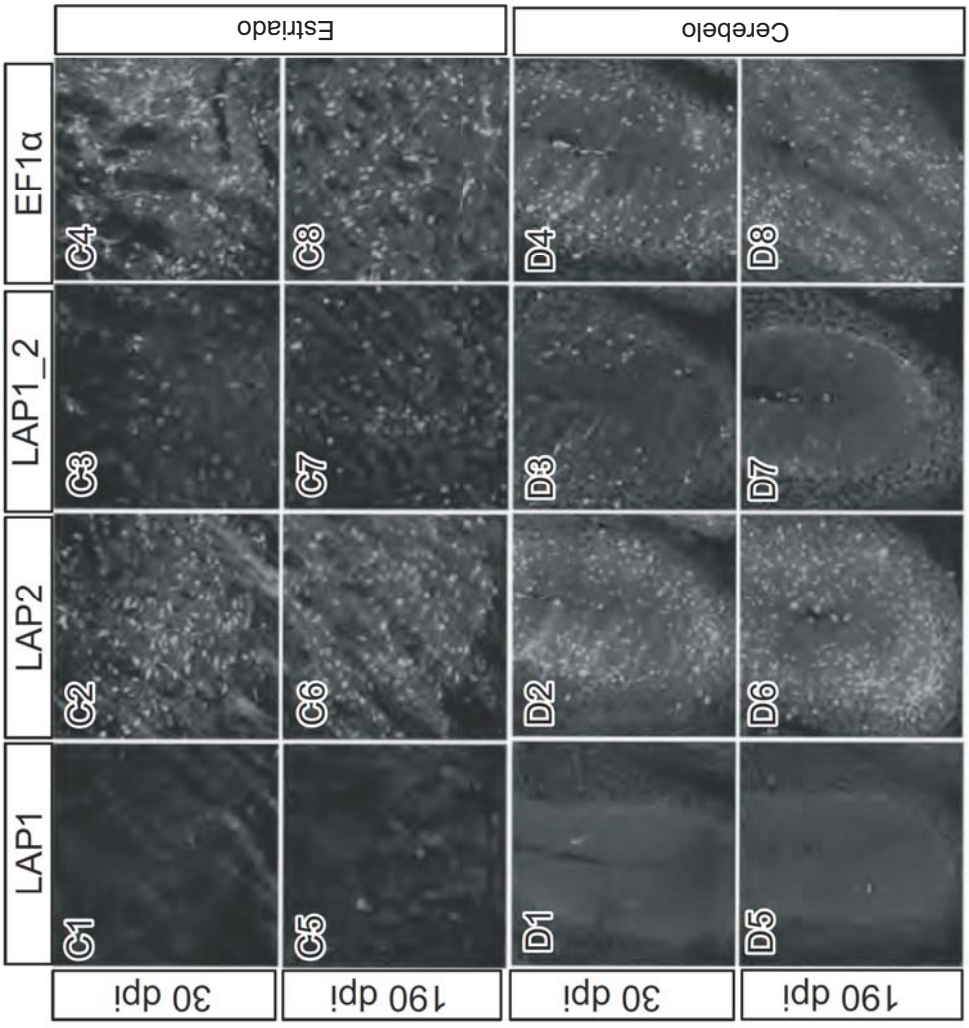

Estriado
Cerebelo
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
30 dpi
190 dpi
30 dpi
190 dpi
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8

FIG. 4C

FIG. 4D

FIG. 4E1

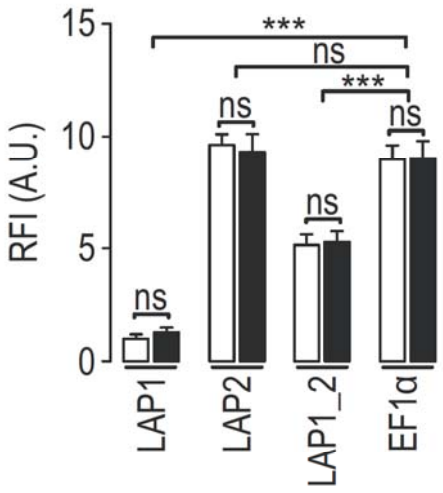


FIG. 4E3

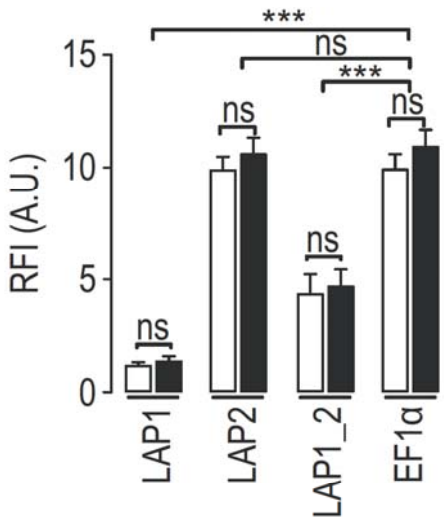


FIG. 4E2

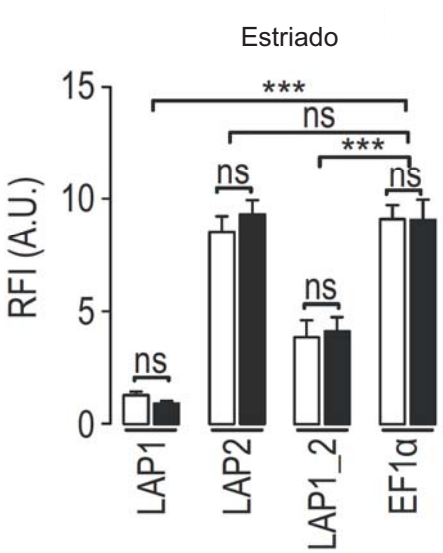
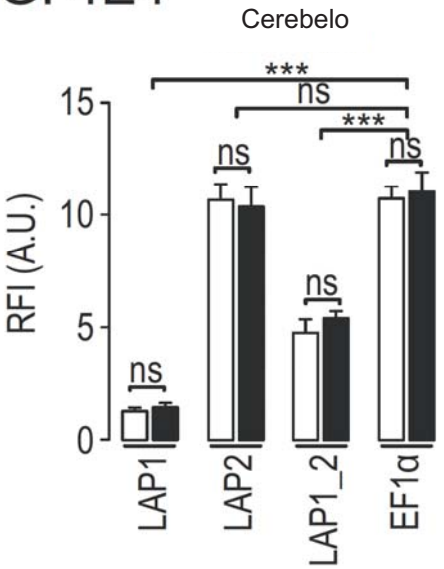


FIG. 4E4





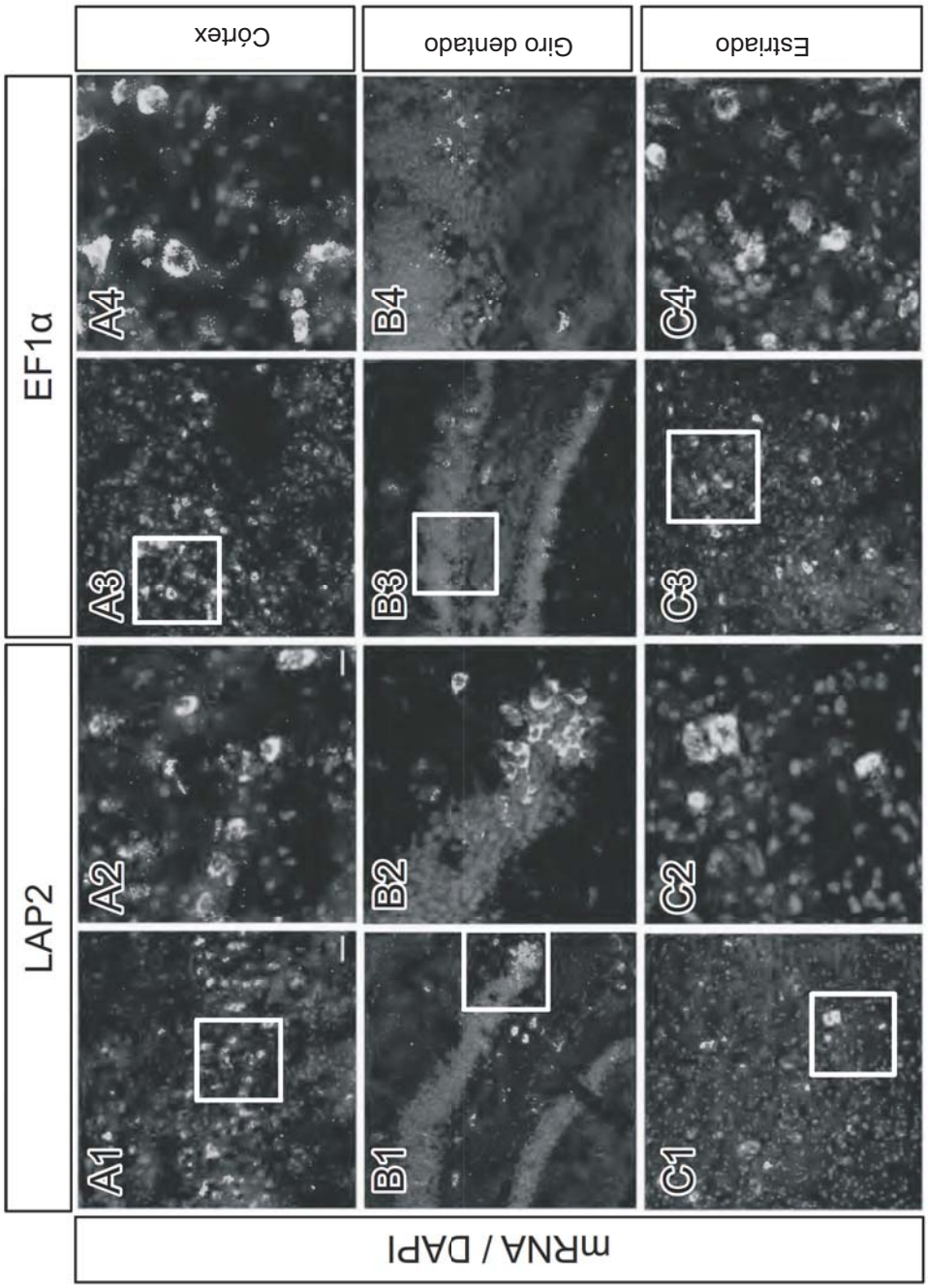


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

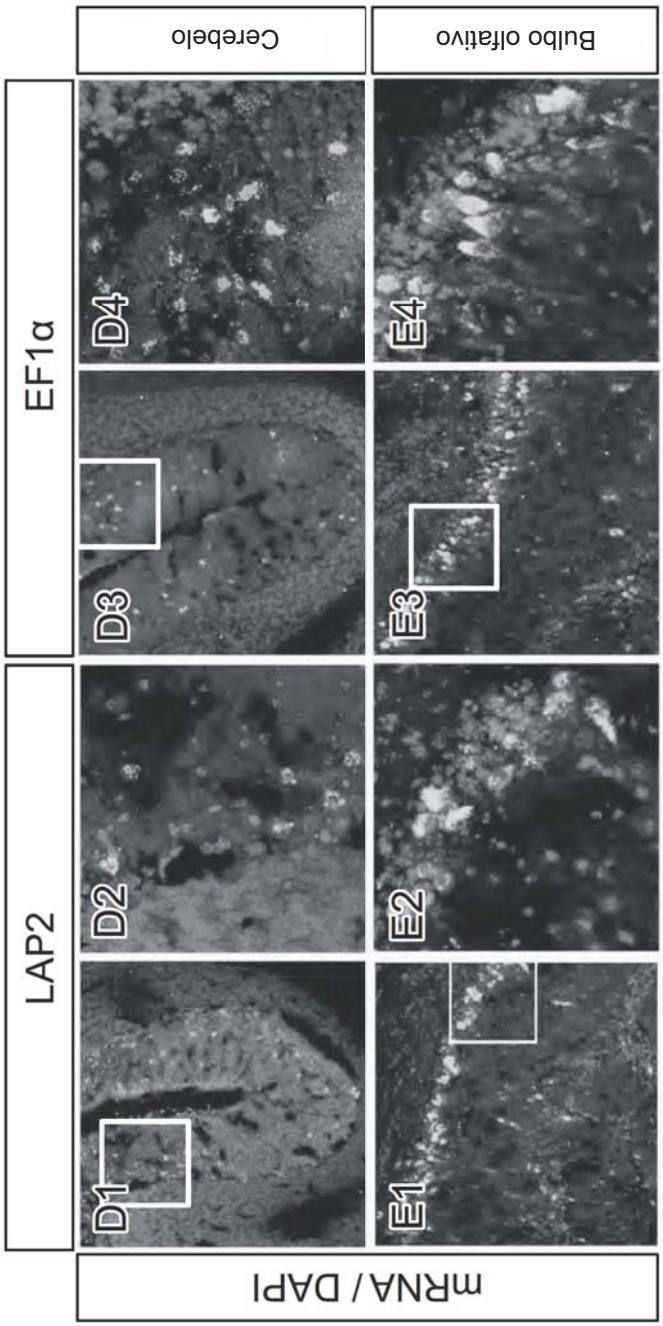

mRNA / DAPI
LAP2
EF1α
Cerebelo
Bulbo olfativo
D1
D2
D3
D4
E1
E2
E3
E4

FIG. 5D

FIG. 5E

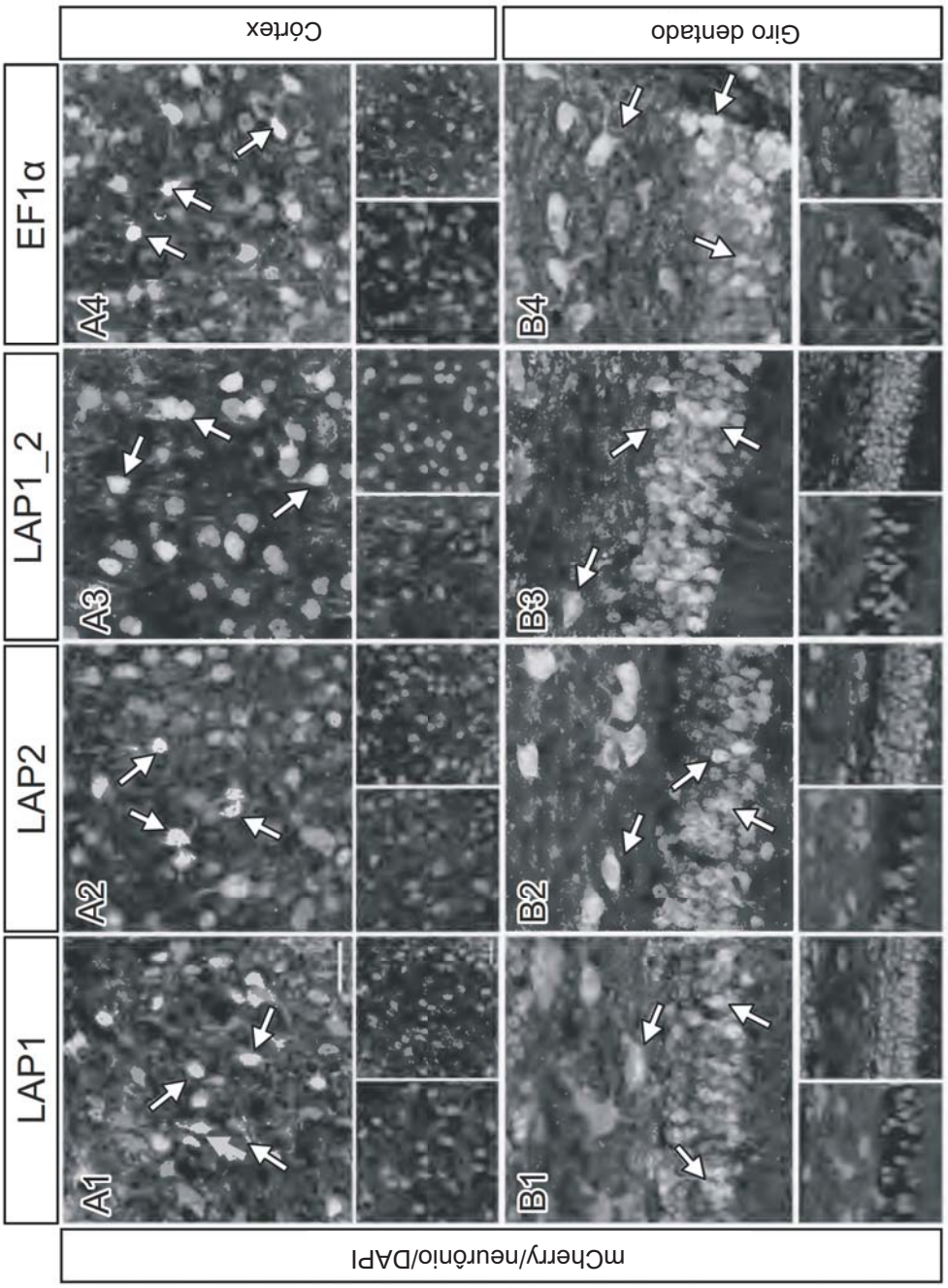

mCherry/neurônio/DAPI
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
Córtex
Giro dentado
A1
A2
A3
A4
B1
B2
B3
B4

FIG. 6A

FIG. 6B

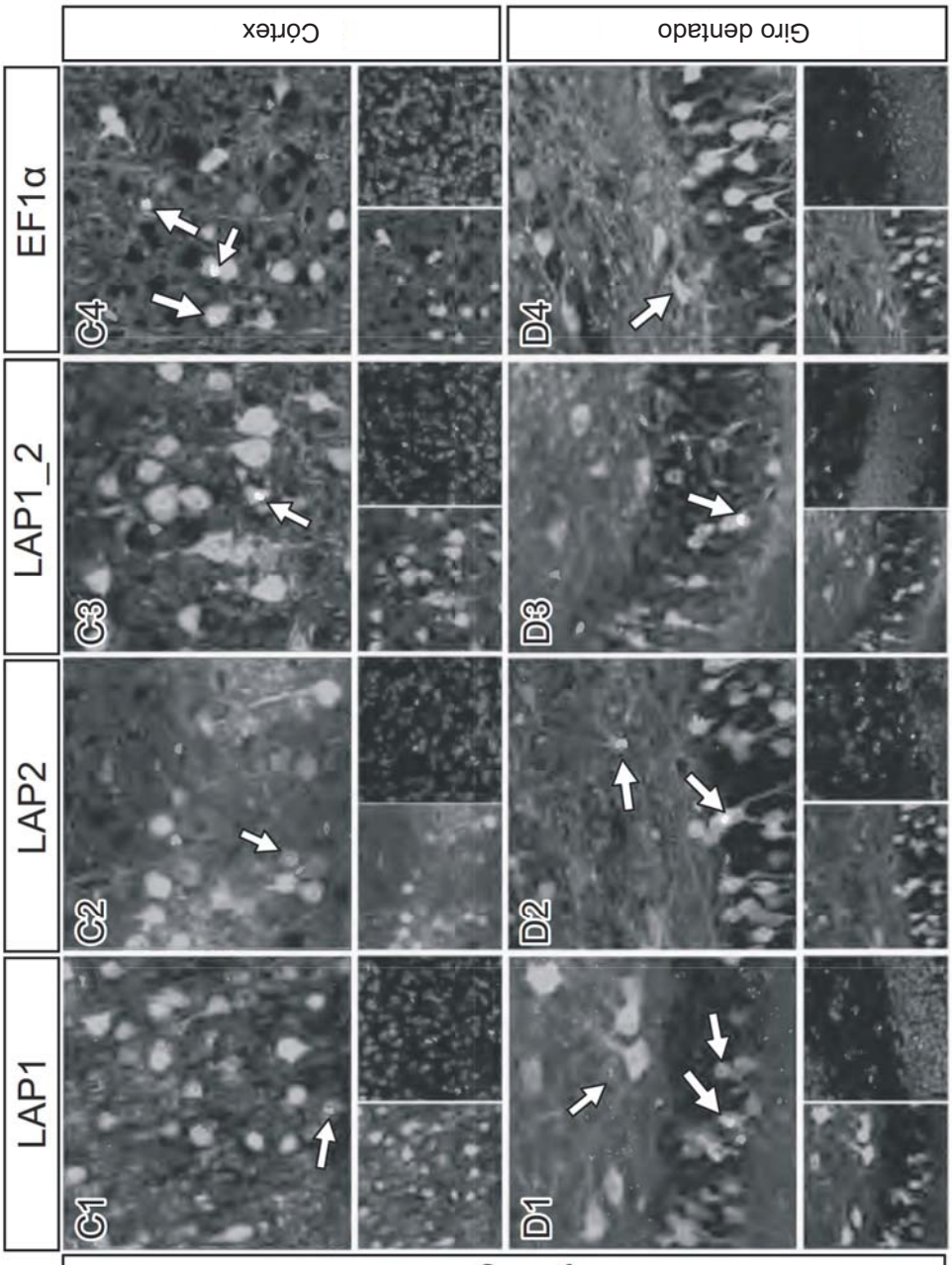

mCherry/Olig2/DAPI
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
Córtex
Giro dentado
C1
C2
C3
C4
D1
D2
D3
D4

FIG. 6C

FIG. 6D

FIG. 6F

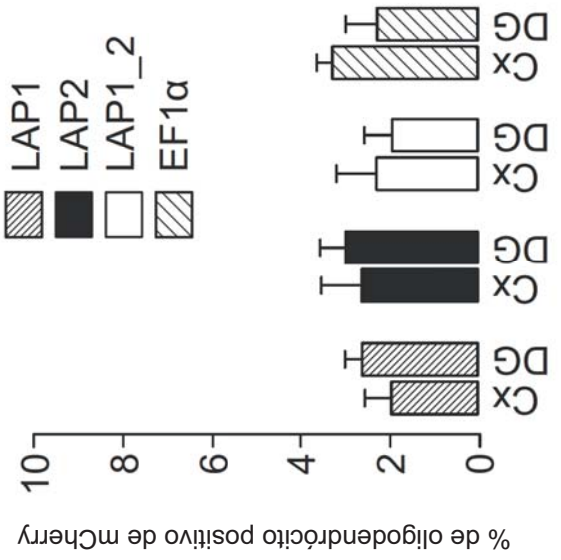
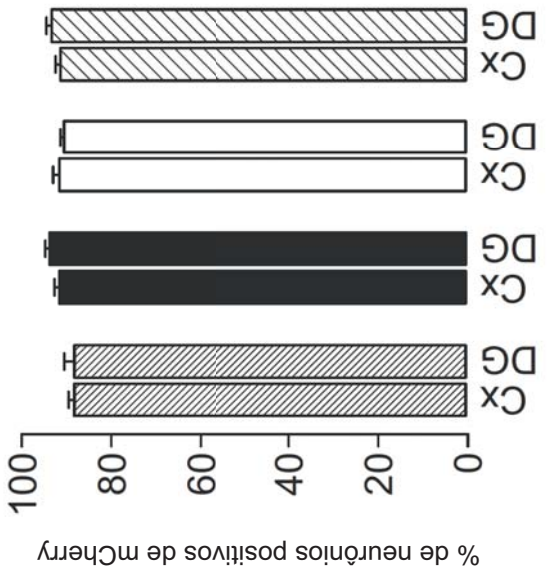

LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
0
2
4
6
8
10
% de oligodendrócito positivo de mCherry
Cx
DG

FIG. 6E


0
20
40
60
80
100
% de neurônios positivos de mCherry
Cx
DG

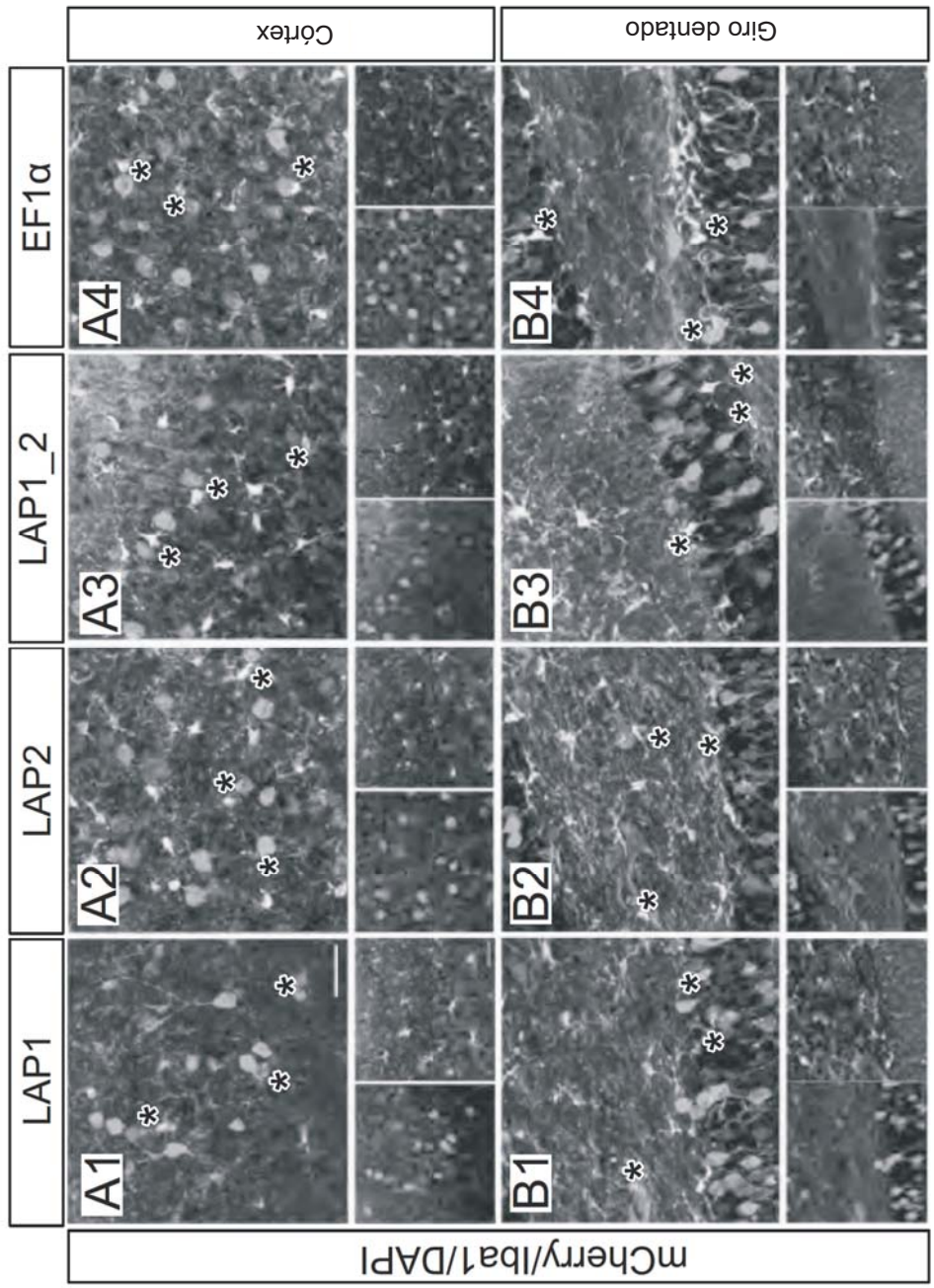

mCherry/Iba1/DAPI
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
Córtex
Giro dentado
A1
A2
A3
A4
B1
B2
B3
B4

FIG. 7A

FIG. 7B

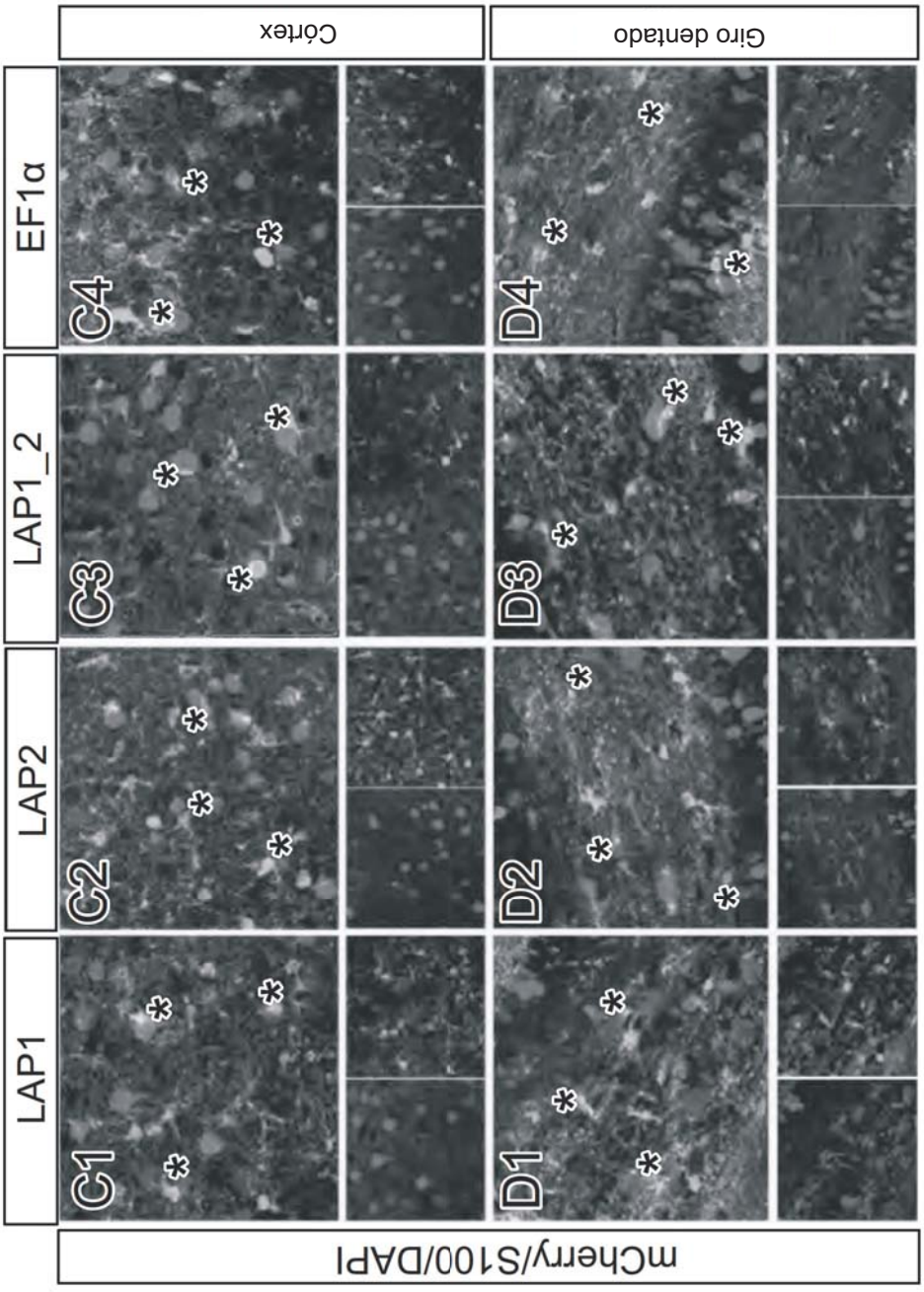

mCherry/S100/DAPI
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α
Córtex
Giro dentado
C1
C2
C3
C4
D1
D2
D3
D4

FIG. 7C

FIG. 7D

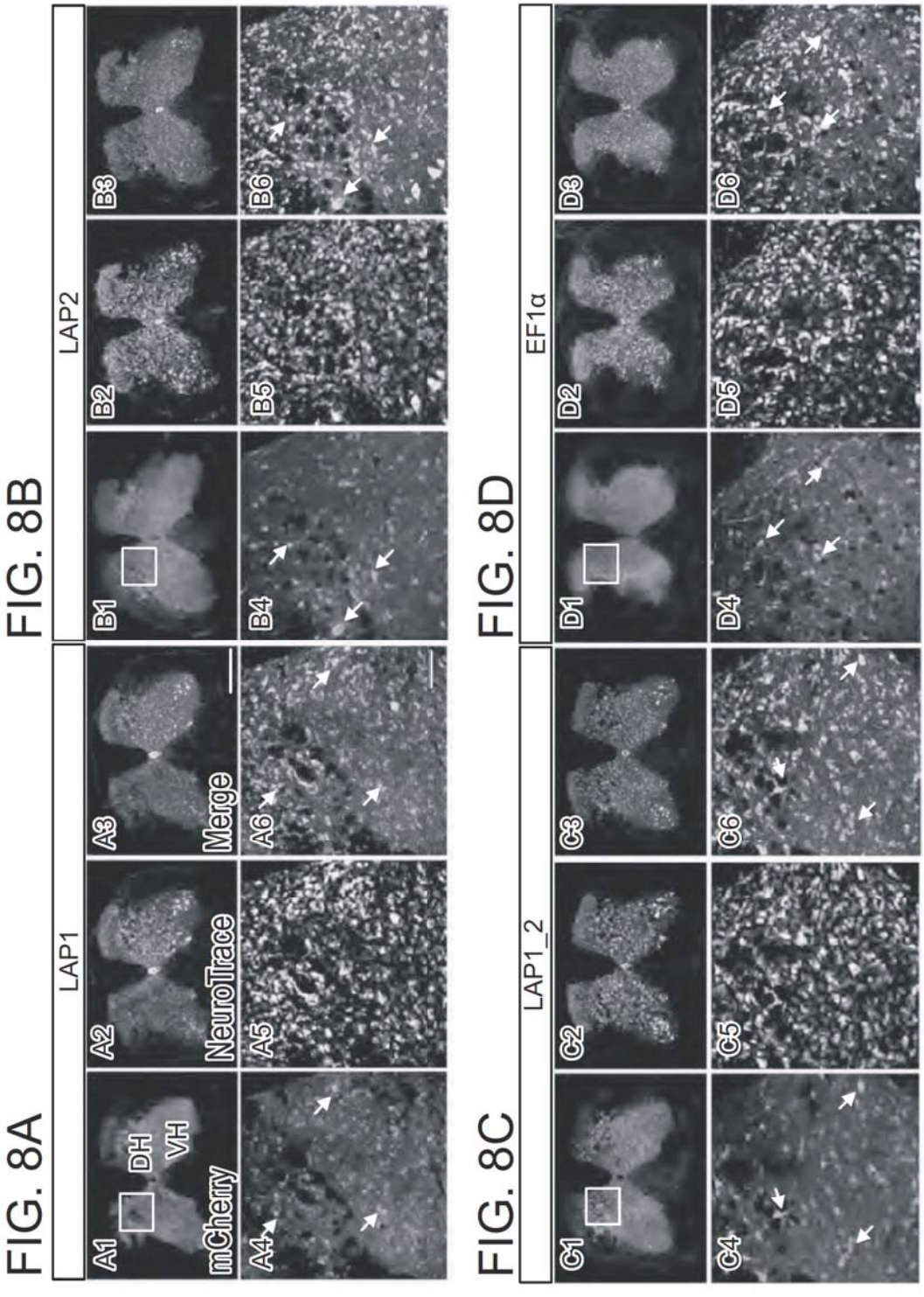

FIG. 8A
LAP1
LAP2
A1
DH
VH
mCherry
A2
NeuroTrace
A3
Merge
A4
A5
A6
B1
B2
B3
B4
B5
B6
FIG. 8B
FIG. 8C
LAP1_2
EF1α
C1
C2
C3
C4
C5
C6
D1
D2
D3
D4
D5
D6
FIG. 8D

FIG. 8E

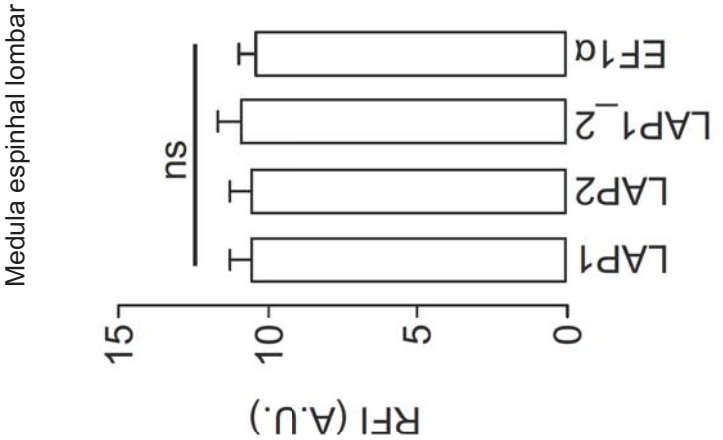
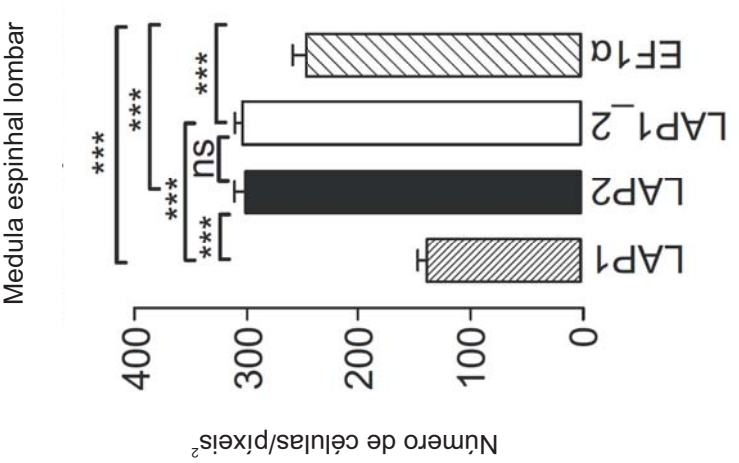

Medula espinhal lombar
RFI (A.U.)
15
10
5
0
ns
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α

FIG. 8F


Medula espinhal lombar
Número de células/pixels²
400
300
200
100
0
***
***
***
ns
***
LAP1
LAP2
LAP1_2
EF1α

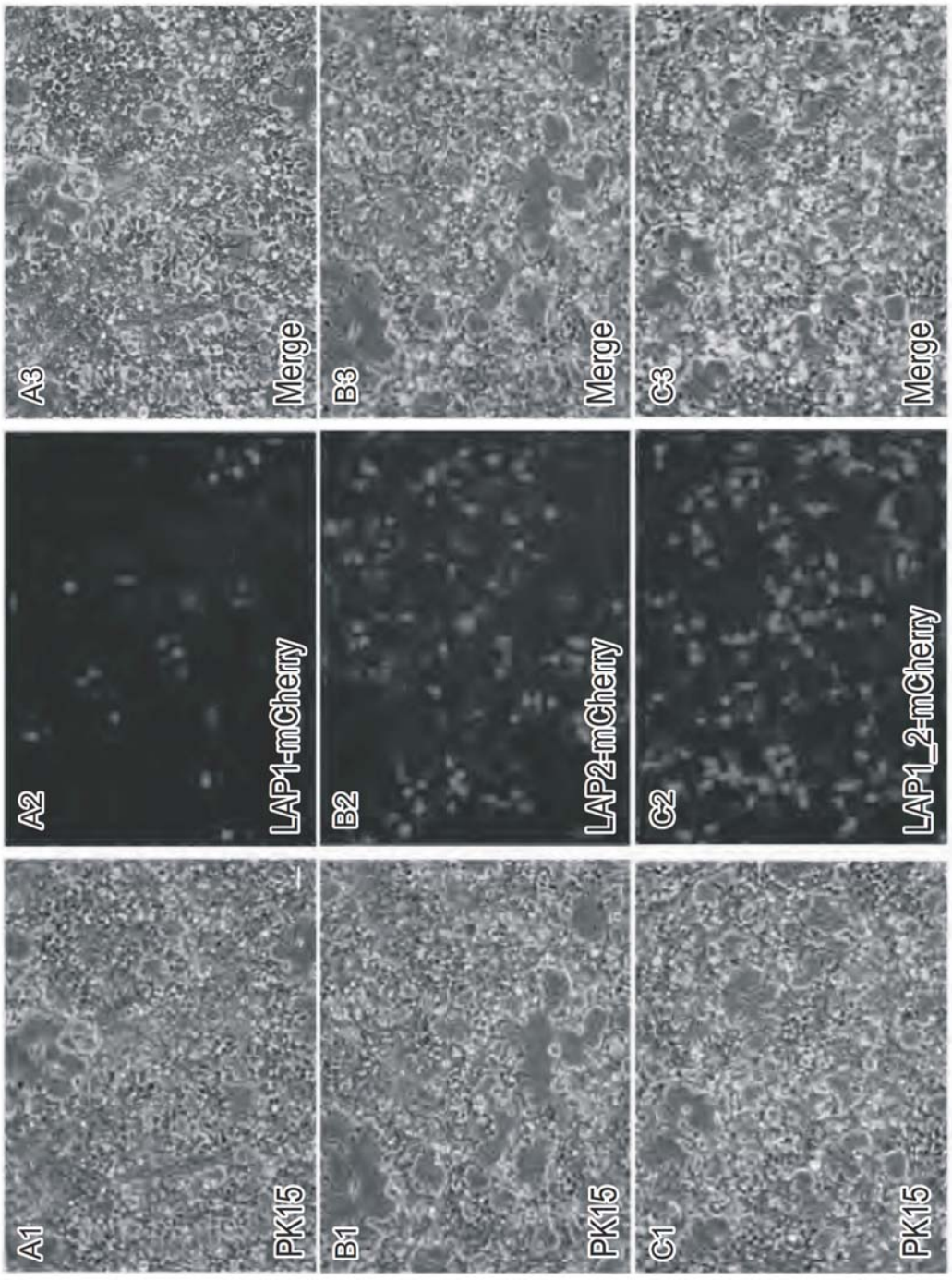


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

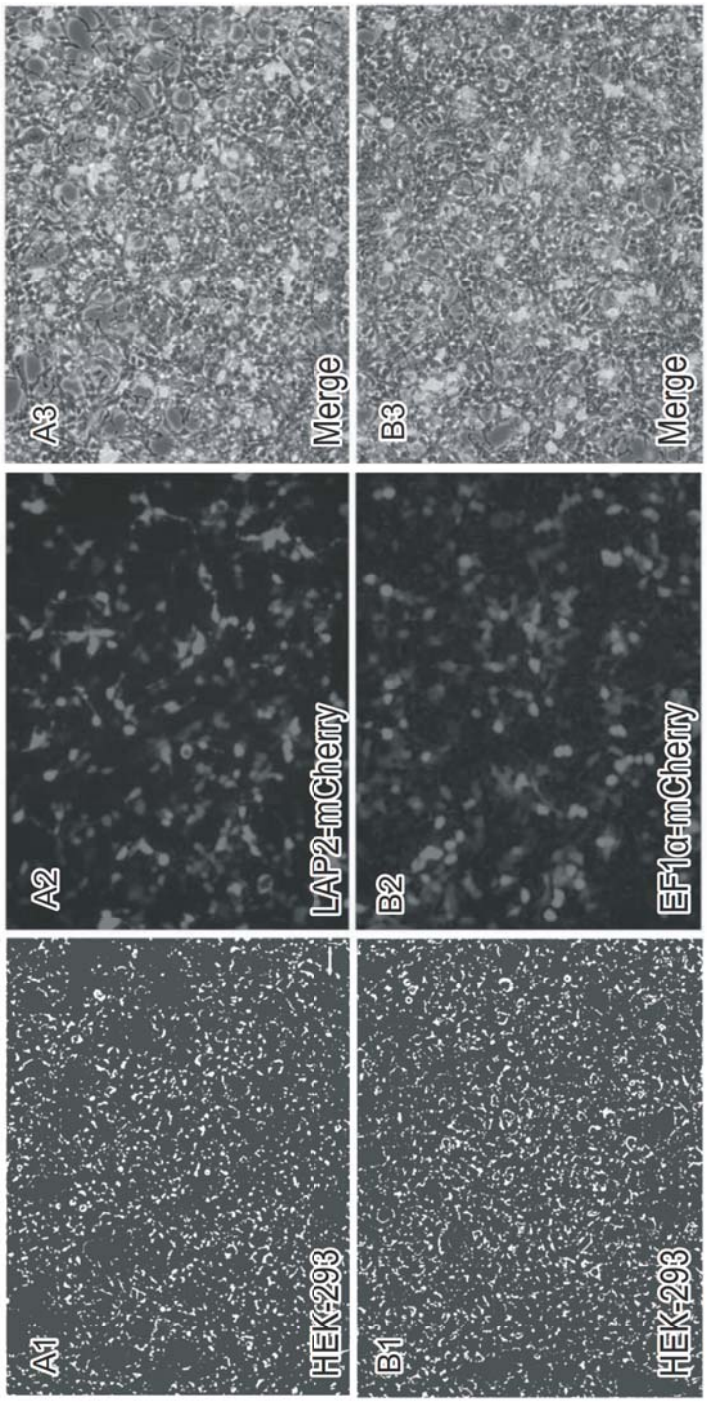


FIG. 10A

FIG. 10B

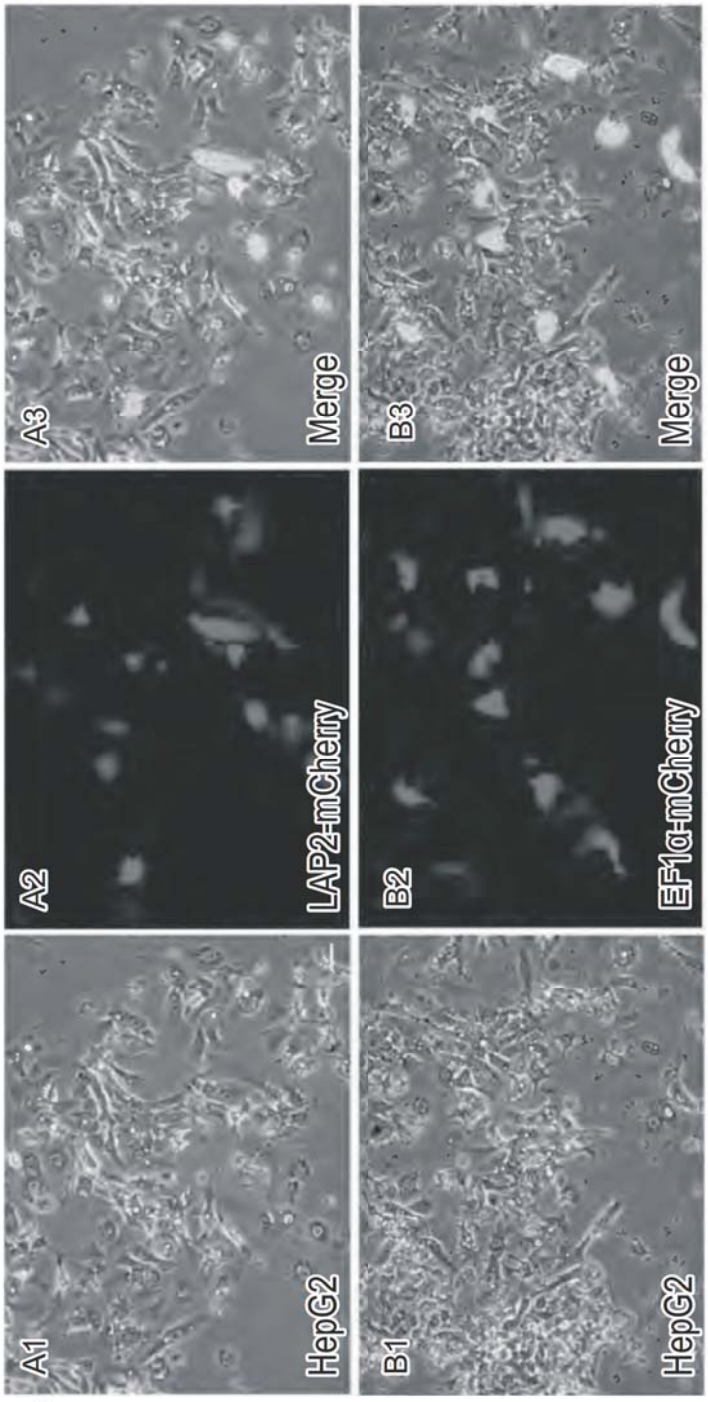
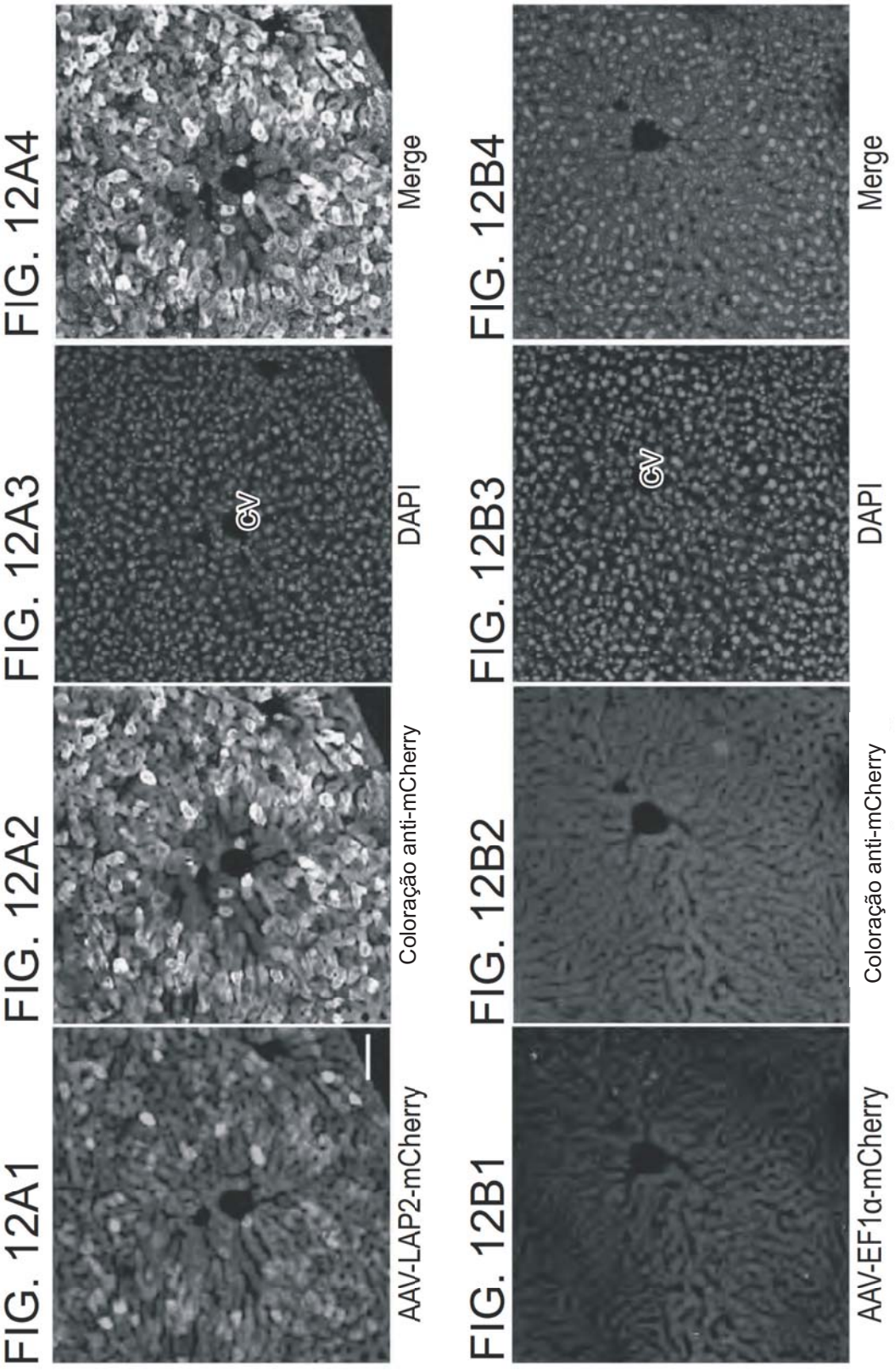
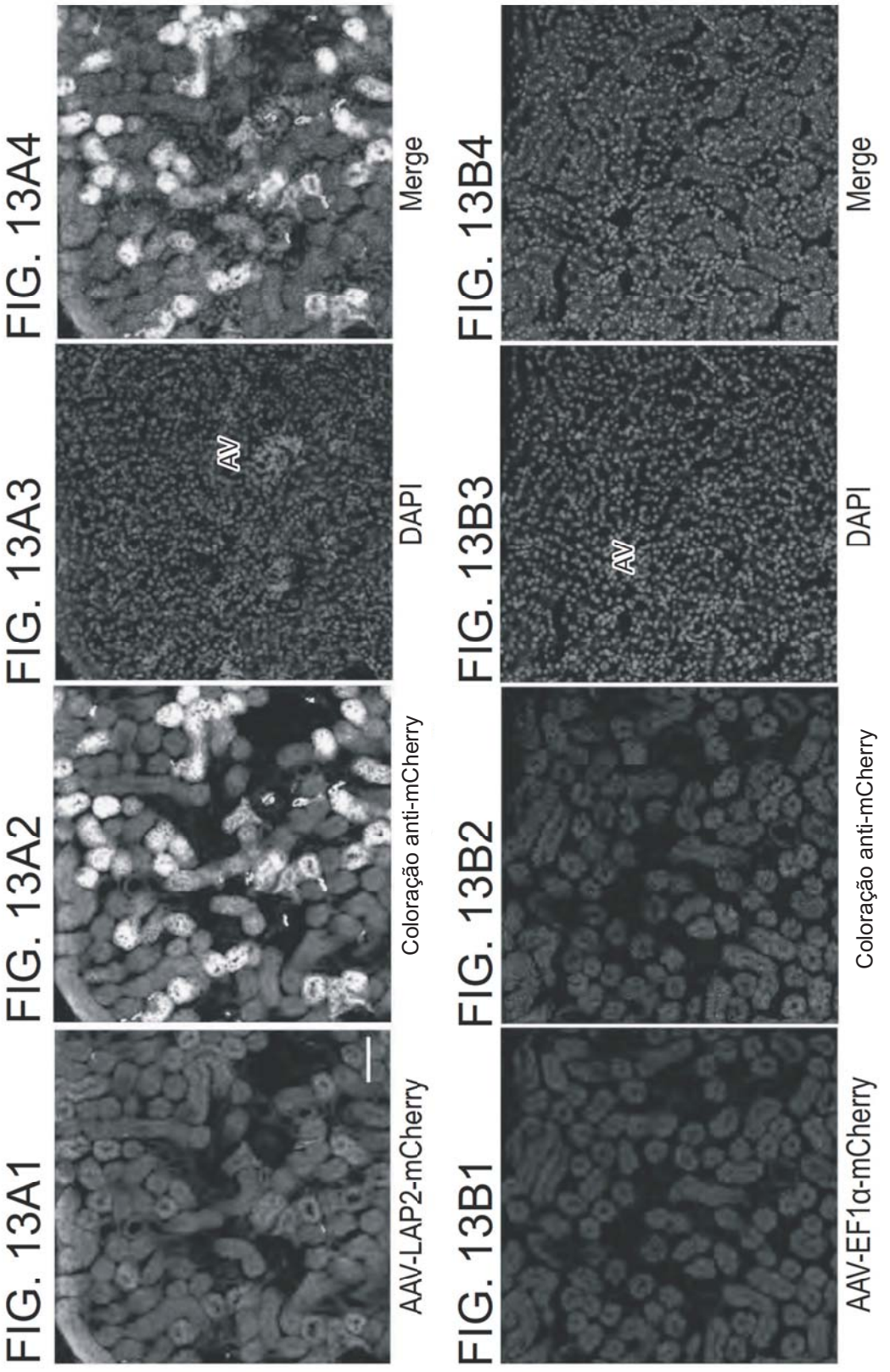
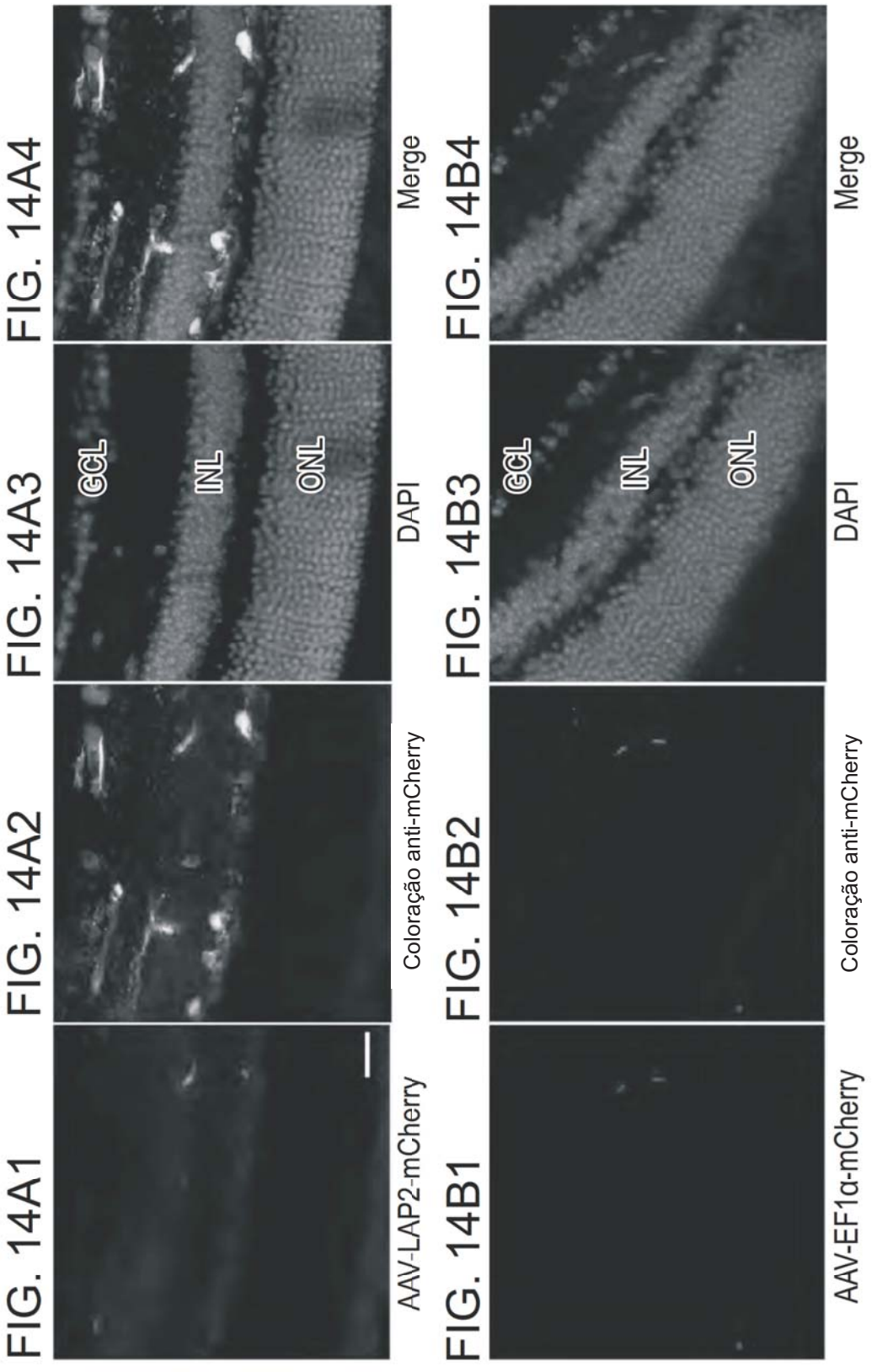


FIG. 11A

FIG. 11B


FIG. 12A1
FIG. 12A2
FIG. 12A3
FIG. 12A4
CV
AAV-LAP2-mCherry
Coloração anti-mCherry
DAPI
Merge
FIG. 12B1
FIG. 12B2
FIG. 12B3
FIG. 12B4
CV
AAV-EF1α-mCherry
Coloração anti-mCherry
DAPI
Merge


FIG. 13A1
FIG. 13A2
FIG. 13A3
FIG. 13A4
AV
AAV-LAP2-mCherry
Coloração anti-mCherry
DAPI
Merge
FIG. 13B1
FIG. 13B2
FIG. 13B3
FIG. 13B4
AV
AAV-EF1α-mCherry
Coloração anti-mCherry
DAPI
Merge


FIG. 14A1
FIG. 14A2
FIG. 14A3
FIG. 14A4
GCL
INL
ONL
AAV-LAP2-mCherry
Coloração anti-mCherry
DAPI
Merge
FIG. 14B1
FIG. 14B2
FIG. 14B3
FIG. 14B4
GCL
INL
ONL
AAV-EF1α-mCherry
Coloração anti-mCherry
DAPI
Merge

RESUMO

Patente de Invenção: **"ÁCIDOS NUCLEICOS RECOMBINANTES CONTENDO SEQUÊNCIAS PROMOTORAS DE ALFA-HERPESVÍRUS".**

A presente invenção refere-se a ácidos nucleicos recombinantes (por exemplo, vetores) e métodos relacionados, para a expressão de um gene alvo em uma célula hospedeira. Os ácidos nucleicos recombinantes compreendem um promotor compreendendo uma sequência de ácido nucleico com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência selecionada a partir de SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº: 4, SEQ ID Nº: 5, SEQ ID Nº: 6, SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 8 e SEQ ID Nº: 9; um sítio de clonagem para inserção de um ácido nucleico que codifica o gene alvo; e pelo menos um elemento regulador não promotor necessário para a expressão do gene alvo na célula hospedeira.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P254779 ListSeq.TXT
- Data de Geração do Código: 03/08/2021
- Hora de Geração do Código: 10:39:50
- Código de Controle:
  - Campo 1: 4742D3EB95FF336A
  - Campo 2: B9087513EE89C8F6