



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

(21) BR 112021015817-0 A2



(22) Data do Depósito: 21/02/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 13/10/2021

(54) **Título:** VÍRUS ADENO-ASSOCIADO RECOMBINANTE PARA TRATAMENTO DE NEURODEGENERAÇÃO COM INÍCIO NA IDADE ADULTA ASSOCIADO A GRN

(51) **Int. Cl.:** A61K 48/00; C12N 15/861.

(30) **Prioridade Unionista:** 02/02/2020 US 62/969,108; 21/10/2019 US 62/923,812; 22/02/2019 US 62/809,329.

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

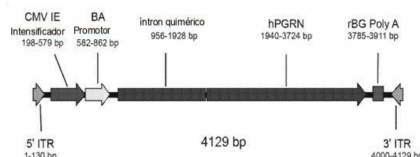
(72) **Inventor(es):** CHRISTIAN HINDERER; NIMROD MILLER; JAMES M. WILSON.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2020019149 de 21/02/2020

(87) **Publicação PCT:** WO 2020/172490 de 27/08/2020

(85) **Data da Fase Nacional:** 11/08/2021

(57) **Resumo:** VÍRUS ADENO-ASSOCIADO RECOMBINANTE PARA TRATAMENTO DE NEURODEGENERAÇÃO COM INÍCIO NA IDADE ADULTA ASSOCIADO A GRN. É fornecido um AAV recombinante (rAAV) adequado para uso no tratamento da neurodegeneração de início na idade adulta causada pela haploinsuficiência de granulina (GRN), tal como a demência frontotemporal (FTD) relacionada à progranulina (PGRN). O rAAV compreende (a) um capsídeo de vírus adeno-associado 1 e (b) um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina. São também fornecidos um método para tratar um paciente humano com PGRN-FTD e outra neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de granulina (GRN), compreendendo a administração ao sistema nervoso central (SNC) de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) com um capsídeo de vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VÍRUS ADENO-ASSOCIADO RECOMBINANTE PARA TRATAMENTO DE NEURODEGENERAÇÃO COM INÍCIO NA IDADE ADULTA ASSOCIADO A GRN"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

[001] Este pedido reivindica o benefício e a prioridade dos Pedidos Provisórios U.S. Nº 62/809.329, depositado em 22 de fevereiro de 2019, 62/923.812, depositado em 21 de outubro de 2019, e 62/969.108, depositado em 2 de fevereiro de 2020, que estão incorporados neste documento por referência em sua totalidade para todos os fins.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] A demência frontotemporal (FTD) é uma doença neurodegenerativa fatal que geralmente se apresenta na sexta ou sétima década de vida com déficits nas funções executivas, comportamento, fala ou compreensão da linguagem. Esses sintomas estão associados com um padrão característico de atrofia cerebral que afeta os córtices frontal e temporal. Os pacientes apresentam universalmente um curso progressivo, com uma sobrevida média de 8 anos a partir do início dos sintomas (Coyle-Gilchrist IT, et al. Neurology. 2016;86(18):1736-43).

[003] A FTD é altamente hereditária, com aproximadamente 40% dos pacientes com histórico familiar positivo (Rohrer JD, et al. Neurology. 2009;73(18):1451-6.). Em 5-10% dos pacientes com FTD, mutações patogênicas de perda de função podem ser identificadas no gene da granulina (GRN) que codifica a progranulina (PGRN), uma proteína lisossomal ubíqua (Rohrer JD, et al. Neurology. 2009;73(18):1451-6). Os carreadores da mutação de GRN exibem atrofia cerebral rápida e muito espalhada e podem apresentar características clínicas de outras doenças neurodegenerativas, tais como paralisia supranuclear progressiva, síndrome corticobasal, doença de Parkinson, demência com

corpos de Lewy ou doença de Alzheimer (Le Ber I, et al. *Brain: a journal of neurology*. 2008;131(3):732-46.). As mutações de GRN são herdadas de forma autossômica dominante com mais de 90% de penetração aos 70 anos (Gass J, et al. *Human molecular genetics*. 2006;15(20):2988-3001). Embora a herança de uma única mutação de GRN cause FTD e outras doenças neurodegenerativas de início tardio, os pacientes com mutações de perda de função homozigótica apresentam-se muito mais cedo na vida com lipofuscinose ceróide neuronal (NCL, doença de Batten), caracterizada pelo acúmulo de material autofluorescente (lipofuscina) nos lisossomos dos neurônios, declínio cognitivo rápido e degeneração da retina (Smith Katherine R, et al. *American Journal of Human Genetics*. 2012;90(6):1102-7). Embora os pacientes heterozigotos para mutações GRN tenham o início dos sintomas muito mais tarde, basicamente desenvolvem lesões de armazenamento lisossomal no cérebro e na retina idênticas às dos pacientes com NCL e da mesma forma experimentam neurodegeneração progressiva (Ward ME, et al. *Science Translational Medicine*. 2017;9(385); Gotzl JK, et al. *Acta neuropathologica*. 2014;127(6):845-60). Descobriu-se recentemente que a progranulina desempenha um papel crítico na função lisossomal, promovendo a acidificação dos lisossomas e servindo como acompanhante para proteases lisossomais, incluindo a catepsina D (CTSD) (Beel S, et al. *Human molecular genetics*. 2017 Aug 1;26(15):2850-2863; Tanaka Y, et al. *Human molecular genetics*. 2017;26(5):969-88). Mutações no gene que codifica CTSD também resultam em um fenótipo NCL, apoiando a fisiopatologia comum relacionada à atividade deficiente da protease lisossomal (Siintola E, et al. *Brain: a journal of neurology*. 2006;129(Pt 6):1438-45).

[004] Atualmente não há terapias modificadoras da doença para a neurodegeneração de início na idade adulta causada pela haploinsuficiência de GRN. O gerenciamento da doença inclui cuidados de su-

porte e tratamentos sem bula destinados a reduzir os sintomas comportamentais, cognitivos e/ou de movimento associados à doença (Tsai e Boxer, 2016, J Neurochem. 138 Suplemento 1: 211-21). Além disso, mais pacientes podem ser alcançados em um estágio inicial com a triagem de sujeitos com um histórico familiar de demência, o que atualmente não é indicado em vista da falta de tratamento. Assim, esse espectro de doenças representa uma área de alta necessidade médica não atendida.

[005] O que são necessários são tratamentos para distúrbios neurodegenerativos de início na idade adulta associados a haploinsuficiências de GRN e para os sintomas associados aos mesmos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] É fornecido um AAV recombinante (rAAV) adequado para uso no tratamento da neurodegeneração causada por demência frontotemporal (FTD) relacionada a progranulina (PGRN) - outras doenças neurodegenerativas de início na idade adulta associadas a haploinsuficiências de GRN. O rAAV compreende um capsídeo de vírus adeno-associado 1 e um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV (ITRs), uma sequência de codificação que codifica uma progranulina humana e sequências regulatórias que direcionam a expressão da progranulina. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende uma repetição terminal invertida 5' (ITR) de AAV, uma sequência de codificação de PGRN humano e elementos reguladores que direcionam sua expressão e um ITR 5' de AAV.

[007] Uma composição farmacêutica compreendendo um líquido aquoso e um AAV recombinante (rAAV) também é fornecida. Em certas modalidades, o líquido aquoso compreende um líquido cefalorraquidiano artificial com um tensoativo, que é adequado para administração intratecal.

[008] É fornecido um método de tratamento de um paciente humano com neurodegeneração por demência frontotemporal (FTD) relacionada à progranulina ou outra doença neurodegenerativa de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de GRN. O método compreende a administração de um rAAV incluindo uma sequência de codificação de progranulina humana ao sistema nervoso central (SNC). O vírus adeno-associado recombinante (rAAV) tendo um capsídeo de vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana, e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

[009] É fornecido um rAAV1.hPGRN para uso em um método para o tratamento de um paciente humano com PGRN-FTD ou outra doença neurodegenerativa de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de GRN. O método compreende a administrar ao SNC um rAAV tendo um capsídeo do vírus 1 adeno-associado que codifica a progranulina humana que tem como alvo as células ependimárias. O rAAV1 compreende ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências regulatórias que direcionam a expressão da progranulina nas células ependimárias. Em uma modalidade, uma progranulina humana secretável é expressa após a administração da terapia genética rAAV1.

[0010] Um método para tratar um paciente humano com lesão cerebral associada com demência frontotemporal (FTD) relacionada à progranulina ou outra doença neurodegenerativa de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de GRN. O método compreendendo administrar ao sistema nervoso central (SNC) um vírus adeno-

associado recombinante (rAAV) tendo um capsídeo de vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana, e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

[0011] Em certas modalidades, os métodos fornecidos neste documento podem compreender ainda (a) avaliar de forma não invasiva o paciente quanto à redução nas lesões de armazenamento da retina como um preditor de redução de lesões cerebrais, (b) realizar imagens de ressonância magnética para avaliar o volume do cérebro e/ou (c) medir a concentração de progranulina no CSF.

[0012] Estes e outros aspectos da invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0013] A FIG. 1 é um mapa linear de um genoma de vetor AAV1.hPGRN. O AAV1.CB7.O genoma do vetor Cl.hPGRN.rBG compreende uma sequência de codificação para PGRN humano sob o controle do promotor CB7 ubíquo, que é composto de um híbrido entre um intensificador de CMV IE e um promotor de β -actina de galinha. Abreviaturas: BA, β -actina; bp, pares de bases; CMV IE, citomegalovírus imediato-inicial; ITR, repetições terminais invertidas; PolyA, poliadenação; rBG, β -globina de coelho.

[0014] A FIG. 2 é um mapa de vetor linear de um plasmídeo cis carregando o genoma do vetor.

[0015] A FIG. 3A - FIG. 3D fornece um histórico natural do acúmulo de lipofuscina e atividade da hexosaminidase em cérebros de camundongos GRN^{-/-}. Camundongos GRN^{-/-} (KO) ou GRN^{+/+} (WT) controles foram sacrificados nas idades indicadas (n = 10 por ponto de tempo). Seções de cérebro não manchadas foram imageadas para mate-

rial autofluorescente (lipofuscina) no hipocampo, tálamo e córtex frontal, e os depósitos de lipofuscina foram quantificados por três revisores cegos e calculados a média (FIG. 3A - FIG. 3C). As contagens de lipofuscina são expressas em relação à área total da região de interesse. A atividade da hexosaminidase foi medida em amostras de cérebro e normalizada para a concentração de proteína total (FIG. 3D). Os valores são expressos como uma razão para controles de tipo selvagem.

[0016] A FIG. 4A - FIG. 4G mostram correção de patologia lisossomal em cérebros de camundongos $GRN^{-/-}$ adultos jovens por expressão de PGRN mediada por AAV. Camundongos $GRN^{-/-}$ (KO) ou $GRN^{+/+}$ (WT) controles foram tratados com uma única injeção ICV de veículo (PBS) ou um vetor AAVhu68 expressando PGRN humano (10^{11} GC) aos 2 meses de idade (n = 10 por grupo). Os animais foram sacrificados 60 dias após a injeção e o PGRN humano foi medido no CSF (FIG. 4A) e nos lobos frontais do cérebro (FIG. 4B) por ELISA. A atividade de hexosaminidase foi medida em amostras de cérebro (FIG. 4C). A concentração de PGRN no cérebro e a atividade Hex foram normalizadas para proteína total. Seções de cérebro não manchadas foram imageadas para material autofluorescente (lipofuscina) no hipocampo, tálamo e córtex frontal. Os depósitos de lipofuscina no hipocampo, tálamo e córtex frontal foram quantificados por um revisor cego (FIG. 4D - FIG. 4G). As contagens de lipofuscina são expressas por campo de alta potência. N = 10 por grupo, exceto hipocampo KO + PBS n = 8. * p < 0,05, ** p < 0,005, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ANOVA de uma via pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. A atividade da hexosaminidase foi medida no soro (FIG. 4G).

[0017] As FIG. 5A - FIG. 5D mostram a correção da patologia lisossomal em cérebros de camundongos $GRN^{-/-}$ idosos por expressão mediada por AAV de PGRN humano. Camundongos $GRN^{-/-}$ (KO) ou $GRN^{+/+}$ (WT) controles foram tratados com uma única injeção ICV de

veículo (PBS) ou um vetor AAVhu68 expressando PGRN humano (10^{11} GC) aos 7 meses de idade. Os animais foram sacrificados 4 meses após a injeção. A atividade da hexosaminidase foi medida em amostras de cérebro (FIG. 5A) e os depósitos de lipofuscina foram quantificados no hipocampo, tálamo e córtex por um revisor cego (FIG. 5B - FIG. 5D). As contagens de lipofuscina são expressas por campo de alta potência. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

[0018] As FIG. 6A - FIG. 6C mostram a correção da microgliose no cérebro em camundongos GRN^{-/-} idosos por expressão de PGRN mediada por AAV. Camundongos GRN^{-/-} (KO) ou GRN^{+/-} (WT) controles foram tratados com uma única injeção ICV de veículo (PBS) ou um vetor AAVhu68 expressando PGRN humano (10^{11} GC) aos 7 meses de idade. Os animais foram sacrificados 4 meses após a injeção, e as seções do cérebro foram manchadas para CD68. As áreas positivas de CD68 em imagens de hipocampo, tálamo e córtex frontal foram quantificadas usando o software ImageJ por um revisor cego (FIG. 6A - FIG. 6C). As áreas são expressas por campo de alta potência. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

[0019] As FIG. 7A - FIG. 7C mostram a expressão de PGRN humano em macacos rhesus após a administração de AAV. Macacos rhesus adultos foram administrados com vetores AAV1, AAV5 ou AAVhu68 (3×10^{13} GC) que expressam PGRN humano de um promotor de beta actina de galinha por injeção de ICM no dia de estudo 0 ($n = 2$ por vetor). Dois macacos adicionais foram administrados com um vetor AAVhu68 expressando hPGRN de um promotor de ubiquitina C (AAVhu68 V2). A injeção de ICM foi realizada sob orientação fluoroscópica. Depois de confirmar a colocação da agulha por fluoroscopia e a injeção de retorno do CSF de material de contraste demonstrou distri-

buição dentro da cisterna magna. O deslocamento do contraste foi aparente durante a infusão de vetor subsequente. O PGRN humano foi medido no CSF de macacos tratados (FIG. 7A) e de sujeitos humanos adultos saudáveis (FIG. 7B) e no soro de macacos tratados (FIG. 7C) por ELISA. Na FIG. 7A e FIG. 7B, as linhas pontilhadas referem-se ao limite de quantificação para hPGRN em CSF na diluição de 1:5.

[0020] As FIG. 8A - FIG. 8C mostram a resposta imune ao PGRN humano em primatas não humanos tratados com vetor. Após ICM administrado de vetores AAV1, AAV5 ou AAVhu68 (3×10^{13} GC) que expressam PGRN humano a partir de um promotor de beta actina de frango ou um promotor de ubiquitina C (AAVhu68 V2), CSF foi coletado semanalmente para análise química e citologia. Contagens aumentadas de leucócitos (predominantemente linfócitos pequenos) foram evidentes na maioria dos animais (FIG. 8A). As respostas de anticorpo a PGRN humano foram medidas por ELISA em CSF (FIG. 8B) e soro (FIG. 8C) de animais tratados com AAVhu68 ou AAV1. Os anticorpos contra PGRN humano não foram avaliados em amostras de soro ou CSF de animais tratados com AAV5.

[0021] A FIG. 9 mostra os níveis de transdução do cérebro após a administração de ICM de vetores AAV1 e AAVhu68 a primatas não humanos. Macacos rhesus adultos foram administrados com 3×10^{13} GC AAVhu68 ($n = 2$) ou vetores AAV1 ($n = 2$) que expressam GFP de um promotor de beta actina de galinha por injeção de ICM. Os animais foram necropsiados 28 dias após a administração do vetor, e seções de cinco regiões do hemisfério direito do cérebro foram analisadas por imuno-histoquímica de GFP ou imunofluorescência com manchamento para GFP e DAPI. Comanchamento com marcadores de tipos específicos de células (NeuN, GFAP e Olig2) permitiu a quantificação de astrócitos e oligodendrócitos transduzidos. A transdução média de cada tipo de célula foi calculada para todas as regiões do cérebro amostra-

das. Barras de erro = SEM das cinco seções.

[0022] A FIG. 10 fornece uma tabela que mostra a transdução de neurônio, astrócito e oligodendrócito percentual após a administração de ICM de vetores AAV1 (ID 1826 e 2068 animal) e AAVhu68 (ID 1518 e 2076 animal) para primatas não humanos. Macacos rhesus adultos foram administrados com 3×10^{13} GC AAVhu68 ($n = 2$) ou vetores AAV1 ($n = 2$) que expressam GFP de um promotor de beta actina de galinha por injeção de ICM no dia de estudo 0. Os animais foram necropsiados 28 dias após a administração do vetor, e seções de cinco regiões do hemisfério direito do cérebro foram analisadas por imunofluorescência GFP com comanchamento para tipos de células específicos (NeuN, GFAP e Olig2). Células totais de cada tipo de célula e o número de células que expressam GFP de cada tipo foram quantificados usando o software HALO. A porcentagem de cada tipo de célula transduzida é mostrada para cada região. Para alguns animais, foram analisadas duas seções da região 5.

[0023] A FIG. 11A - FIG. 11B mostram resultados de estudos de condução do nervo sensorial mediano em primatas não humanos. O eixo Y representa as latências do início à amplitude do pico (latência do pico) medidas ao longo do tempo (eixo x) após a administração de três doses diferentes (3×10^{12} GC, 1×10^{13} GC, or 3×10^{13} GC de rAAV1.hPGRN ou um controle de veículo).

[0024] A FIG. 12A - FIG. 12D mostram resultados de estudos neuropatológicos de gânglios da raiz dorsal (DRG), nervo mediano e medula espinhal (SC) em primatas não humanos (NHP), 90 dias após o tratamento com rAAV1.hPGRN.

[0025] A FIG. 13 mostra um fluxograma de processo de fabricação para produção de vetor. *Abreviaturas*: AEX, troca aniônica; CRL, Charles River Laboratories; ddPCR, reação em cadeia da polimerase digital de gotículas; DMEM, meio Eagle modificado de Dulbecco; DNA, ácido

desoxirribonucleico; FFB, tampão de formulação final; GC, cópias do genoma; HEK293, células 293 de rim embrionário humano; ITFFB, tampão de formulação final intratecal; PEI, polietilenimina; SDS-PAGE, electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio; TFF, filtração de fluxo tangencial; USP, United States Pharmacopeia; WCB, banco de células de trabalho.

[0026] A FIG. 14 mostra um fluxograma de processo de fabricação para formulação de vetor. Processo de fabricação produzir o produto fármaco GTP-205. *Abreviaturas:* Ad5, adenovírus sorotipo 5; AUC, ultracentrifugação analítica; BDS, substância de fármaco a granel; BSA, albumina de soro bovino; CZ, Crystal Zenith; ddPCR, reação em cadeia da polimerase digital de gotículas; E1A, região inicial 1A (gene); ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática; FDP, produto fármaco final; GC, cópias do genoma; HEK293, células 293 de rim embrionário humano; ITFFB, tampão de formulação final intratecal; KanR, resistência à canamicina (gene); MS, espectrometria de massa; NGS, sequenciamento de próxima geração; qPCR, reação em cadeia da polimerase quantitativa; SDS-PAGE, electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio; TCID₅₀ 50% da dose infectante da cultura de tecidos; UPLC, cromatografia líquida de ultra desempenho; USP, United States Pharmacopeia.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0027] Um AAV recombinante (rAAV) adequado para uso no tratamento de condições neurodegenerativas associadas a haploinsuficiências de GRN, tal como progranulina (PGRN) - demência temporal frontal relacionada (FTD), e composições contendo o mesmo são fornecidos. Em certas modalidades preferidas, o rAAV compreende um capsídeo de vírus adeno-associado 1 e um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para

uma progranulina humana e sequências regulatórias que direcionam a expressão da progranulina. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende uma repetição terminal invertida 5' (ITR) de AAV, uma sequência de codificação de PGRN humano e elementos reguladores que direcionam sua expressão e um ITR 3' de AAV. Uma composição farmacêutica compreendendo um líquido aquoso e um AAV recombinante (rAAV) também é fornecida. Em certas modalidades, o líquido aquoso compreende um líquido cefalorraquidiano artificial com um tensoativo, que é adequado para administração intratecal. Também são fornecidos métodos para tratar um paciente humano com PGRN-FTD e/ou tratar um paciente com lesões cerebrais associadas a PGRN-FTD. Em certas modalidades, são fornecidos métodos para tratar ou reduzir a microgliose em um paciente. O método compreende administrar um rAAV.PGRN ao sistema nervoso central (SNC). Em certas modalidades, os métodos fornecidos neste documento podem compreender ainda monitorar o tratamento por (a) avaliação de forma não invasiva do paciente quanto à redução nas lesões de armazenamento da retina como um preditor de redução de lesões do cérebro, (b) realização de imagens de ressonância magnética para avaliar o volume do cérebro e/ou (c) medir a concentração de PGRN no CSF. Opcionalmente, a concentração de PGRN no plasma pode ser medida.

[0028] Como usado neste documento, os termos "AAV.hPGRN" ou "rAAV.hPGRN" são usados para se referir a um vírus adeno-associado recombinante que tem um capsídeo de AAV tendo dentro dele um genoma de vetor compreendendo uma sequência de codificação de progranulina humana sob o controle de sequências regulatórias. Podem ser especificados tipos de capsídeo específicos, tais como, por exemplo, AAV1.hPGRN, que refere-se a um AAV recombinante tendo um capsídeo de AAV1; AAVhu68.hPGRN, que refere-se a AAV recombinante com um capsídeo de AAVhu68; AAV5.hPGRN refere-se a um

AAV recombinante com um capsídeo de AAV5.

[0029] Um "AAV recombinante" ou "rAAV" é uma partícula viral resistente a DNase contendo dois elementos, um capsídeo de AAV e um genoma de vetor contendo pelo menos sequências de codificação não AAV empacotadas dentro do capsídeo de AAV. A menos que especificado de outra forma, este termo pode ser usado alternadamente com a expressão "vetor rAAV". O rAAV é um "vírus de replicação defeituosa" ou "vetor viral", uma vez não tem nenhum gene rep de AAV funcional ou gene cap de AAV funcional e não pode gerar progênie. Em certas modalidades, as únicas sequências de AAV são as sequências de repetição terminal invertida (ITRs) de AAV, normalmente localizadas nas extremidades 5' e 3' extremas do genoma do vetor, a fim de permitir que o gene e as sequências regulatórias localizadas entre as ITRs sejam empacotados dentro do capsídeo AAV.

[0030] Como usado neste documento, um "genoma de vetor" refere-se à sequência de ácido nucleico empacotada dentro do capsídeo de rAAV que forma uma partícula viral. Uma sequência de ácido nucleico como essa contém sequências de repetição terminal invertida (ITRs) de AAV. Nos exemplos aqui descritos, um genoma de vetor contém, no mínimo, de 5'a 3', um AAV 5' ITR, sequência(s) de codificação e um AAV 3' ITR. ITRs de AAV2, um AAV de fonte diferente do capsídeo, ou diferente de ITRs de comprimento total podem ser selecionadas. Em certas modalidades, as ITRs são da mesma fonte de AAV do AAV, que fornece a função rep durante a produção ou um AAV de transcomplementação. Além disso, outras ITRs podem ser usadas. Além disso, o genoma do vetor contém sequências reguladoras que direcionam a expressão do produto do gene. Componentes adequados de um genoma de vetor são discutidos em mais detalhes neste documento.

Proteína Terapêutica e Sequência de Codificação:

[0031] O rAAV inclui uma sequência de codificação para a proteína progranulina humana (hPGRN) ou uma variante da mesma que realiza uma ou mais das funções biológicas de hPGRN. A sequência de codificação desta proteína é modificada no genoma do vetor para expressão no sistema nervoso central (SNC).

[0032] HuPGRN1 é mais comumente caracterizada pela sequência de 593 aminoácidos do GenBank NP_002078, que é reproduzida na SEQ ID NO: 1. Esta sequência contém um peptídeo sinal nas posições 1 a 17, com a proteína progranulina secretada ou granulina(s) secretada(s) compreendendo os aminoácidos 18 a cerca de 593. Esta proteína pode ser clivada em 8 cadeias: granulina 1 (também conhecida como granulina G: cerca de aa 58 a cerca do aminoácido 113), granulina 2 (cerca de aminoácidos 123 a cerca de 179), granulina 3 (cerca do aminoácido 206 a cerca do aminoácido 261), granulina 4 (cerca do aminoácido 281 a cerca do aminoácido 336), granulina 5 (cerca do aminoácido 364 a cerca do aminoácido 417), granulina 6 (cerca do aminoácido 442 a cerca do aminoácido 496) e granulina 7 (cerca do aminoácido 518 a cerca do aminoácido 573), com referência à numeração de SEQ ID NO: 1. Em certas modalidades, um peptídeo sinal heterólogo pode ser substituído pelo peptídeo sinal nativo. No entanto, outras modalidades, podem abranger a progranulina com um peptídeo sinal exógeno (por exemplo, um líder IL2 humano). Ver também, por exemplo, www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia. Assim, as proteínas de fusão contendo progranulina e/ou seus fragmentos são contempladas. Tais proteínas de fusão podem abranger um ou mais de GRN ativas (por exemplo, GRN 1, 2, 3, 4, 4, 6 ou 7) em várias combinações uma com a outra, ou um ou mais desses peptídeos podem ser combinados com PGRN de comprimento total ou outra proteína ou peptídeo (por exemplo, outra proteína ou peptídeo ativo e/ou um

peptídeo sinal exógeno ao PGRN humano).

[0033] O genoma do vetor é modificado para carregar a sequência de codificação para esta proteína e para expressar a proteína em células humanas e, particularmente, no sistema nervoso central. Em certas modalidades, a sequência de codificação pode ser a sequência nativa, encontrada no GenBank: NM_002087.3, que é reproduzida na SEQ ID NO: 2.

[0034] Em certas modalidades, a sequência de codificação é fornecida na SEQ ID NO: 3. Certas outras modalidades abrangerão uma sequência de codificação que está dentro de 95% a 99,9% ou 100% de identidade com a SEQ ID NO: 3, incluindo valores entre as mesmas. Em algumas modalidades, a sequência de codificação é otimizada por códons para um melhor resultado terapêutico, por exemplo, expressão aprimorada em células de mamíferos. A identidade pode ser avaliada ao longo da sequência de codificação com relação a progranulina de comprimento total com a sequência de sinal (líder), ao longo da progranulina sem a sequência de sinal (líder) ou ao longo do comprimento da sequência de codificação com relação a uma proteína de fusão como definido neste documento. Em certas modalidades, a sequência de codificação é fornecida na SEQ ID NO: 3. Certas outras modalidades abrangerão uma sequência de codificação que está dentro de 95% a menos de 100% de identidade com a SEQ ID NO: 4. A identidade pode ser avaliada ao longo da sequência de codificação com relação a progranulina de comprimento total com a sequência de sinal (líder), ao longo da progranulina sem a sequência de sinal (líder) ou ao longo do comprimento da sequência de codificação com relação a uma proteína de fusão como definido neste documento.

[0035] Adequadamente, essas sequências de codificação codificam a progranulina de comprimento total. No entanto, outras modalidades, podem abranger a cadeia de granulina ativa com um peptídeo

sinal heterólogo (por exemplo, um líder IL2 humano). Ver também, por exemplo, www.signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia.

[0036] Em certas modalidades, fragmentos das sequências de codificação para PGRN humano (por exemplo, SEQ ID NO: 3 ou SEQ ID NO: 4), ou uma sequência de cerca de 95% a 99,9% ou 100% idêntica a mesma, podem ser utilizados. Tais fragmentos podem codificar o GRN humano ativo (aa 18-593), ou um peptídeo de fusão compreendendo um peptídeo sinal heterólogo com o GRN humano ativo. Em certas modalidades, uma ou mais das sequências de codificação para um ou mais de GRN ativo (por exemplo, GRN 1, 2, 3, 4, 4, 6 ou 7) podem ser incluídas no genoma do vetor em várias combinações uma com a outra, ou um ou mais desses peptídeos podem ser combinados com o PGRN de comprimento total ou outra sequência de codificação.

[0037] Sem desejar se limitar a nenhuma teoria, acredita-se que a expressão de PGRN mediada por AAV em um subconjunto de células no SNC (por exemplo, células ependimárias) fornece um depósito de proteína secretada. A proteína PGRN secretada (e/ou um ou mais GRN (s)) é captada por outras células por meio de receptores de sortilina ou manose-6-fosfato, onde é subsequentemente trafegada para o lisossoma. Em certas modalidades, a proteína secretada é progranulina. Em certas modalidades, a proteína secretada é uma granulina. Em certas modalidades, a proteína secretada inclui uma mistura de progranulina e granulina (s).

[0038] Em certas modalidades, além da sequência de codificação de progranulina, outra sequência de codificação não AAV pode ser incluída, *por exemplo*, um peptídeo, polipeptídeo, proteína, molécula de RNA funcional (*por exemplo*, miRNA, inibidor de miRNA) ou outro produto genético de interesse. Produtos transgênicos úteis também incluem miRNAs. miRNAs e outros pequenos ácidos nucleicos interferentes regulam a expressão genética por meio da clivagem/degradação do

transcrito do RNA alvo ou repressão translacional do RNA mensageiro alvo (mRNA). Os miRNAs são expressos nativamente, tipicamente como produtos finais de RNA não traduzidos de 19-25. Os miRNAs exibem sua atividade por meio de interações específicas de sequência com as regiões 3' não traduzidas (UTR) dos mRNAs alvo. Esses miRNAs expressos endogenamente formam precursores em hairpin que são subsequentemente processados em um duplex de miRNA e, adicionalmente, em uma molécula de miRNA de fita simples "madura". Este miRNA maduro guia um complexo multiprotéico, miRISC, que identifica o sítio alvo, *por exemplo*, nas regiões UTR 3', de mRNAs alvo com base em sua complementaridade com o miRNA maduro.

[0039] Em certas modalidades, o cassete de expressão compreende ainda uma ou mais sequências alvo de miRNA que reprimem a expressão de hPGRN no gânglio da raiz dorsal (drg). Em certas modalidades, o cassete de expressão compreende pelo menos duas repetições em tandem de sequências alvo de miRNA específicas de drg, em que pelo menos duas repetições em tandem compreendem pelo menos uma primeira sequência de miRNA alvo e pelo menos uma segunda sequência de miRNA alvo que pode ser a mesma ou diferente. Em certas modalidades, as sequências alvo de miRNA em tandem são contínuas ou são separadas por um espaçador de 1 a 10 ácidos nucleicos, em que o dito espaçador não é uma sequência alvo de miRNA. Em certas modalidades, existem pelo menos duas sequências alvo de miRNA específicas de drg localizadas a 3' da sequência de codificação de hPGRN. Em certas modalidades, o início da primeira dentre pelo menos duas repetições em tandem de miRNA específicas de drg está dentro de 20 nucleotídeos da extremidade 3' da sequência de codificação de hPGRN. Em certas modalidades, o início da primeira dentre pelo menos duas repetições em tandem de miRNA específicas de drg é de pelo menos 100 nucleotídeos da extremidade 3' da sequência

de codificação de hPGRN. Em certas modalidades, as repetições em tandem de miRNA compreendem 200 a 1.200 nucleotídeos de comprimento. Em certas modalidades, existem pelo menos duas sequências alvo de miRNA específicas de drg localizadas a 5' da sequência de codificação de hPGRN. Em certas modalidades, pelo menos duas sequências alvo de miRNA específicas de drg são localizadas tanto a 5' quanto a 3' da sequência de codificação de hPGRN. Em certas modalidades, a sequência alvo de miRNA para pelo menos a primeira e/ou pelo menos segunda sequência alvo de miRNA para o cassete de expressão de mRNA ou fita positiva de DNA é selecionada de (i) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA (miR183, SEQ ID NO: 32); (ii) AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA (SEQ ID NO: 33), (iii) AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA (SEQ ID NO: 34); e (iv) AGGGATTCCTGGGAAACTGGAC (SEQ ID NO: 35). Em certas modalidades, duas ou mais sequências alvo de miRNA consecutivas são contínuas e não separadas por um espaçador. Em certas modalidades, duas ou mais das sequências alvo de miRNA são separadas por um espaçador e cada espaçador é independentemente selecionado a partir de um ou mais de (A) GGAT; (B) CACGTG; ou (C) GCATGC. Em certas modalidades, o espaçador localizado entre as sequências alvo de miRNA é localizado 3' em relação à primeira sequência de miRNA alvo e/ou 5' em relação à última sequência de miRNA alvo. Em certas modalidades, os espaçadores entre as sequências alvo de miRNA são os mesmos. Consulte, Pedido de Patente Provisório US No. 62/783.956, depositado em 21 de dezembro de 2018 e Pedido de Patente Internacional No. PCT/US19/67872, depositado em 12 de fevereiro de 2020, que estão incorporados neste documento por referência.

AAV1

[0040] AAVhu68 que é do Clade F pode ser usado para produzir vetores que alvejam e expressam hPGRN no SNC. No entanto, ines-

peradamente observou-se que a administração de PGRN mediada por AAV1 forneceu expressão de PGRN superior no SNC do que AA-Vhu68, embora concentrações plasmáticas comparáveis tenham sido observadas. Os inventores descobriram que a administração intratecal de rAAV1.PGRN é uma via de administração atraente para as terapias descritas neste documento. Assim, em modalidades particularmente desejáveis, um capsídeo de AAV1 é selecionado.

[0041] Em certas modalidades, é fornecida uma composição que compreende um líquido aquoso adequado para injeção intratecal e um estoque de rAAV tendo um capsídeo de AAV que visa preferencialmente células endoteliais, em que o rAAV compreende ainda um genoma de vetor tendo uma sequência de codificação de PGRN para administração ao centro sistema nervoso (SNC). Em certas modalidades, a composição é formulada para injeção sub-occipital na cisterna magna (Intracisterna magna). Em certas modalidades, o rAAV é administrado por meio de uma injeção de rAAV guiada por tomografia computadorizada (CT-). Em certas modalidades, o paciente recebe uma dose única da composição.

[0042] Um capsídeo de AAV1 refere-se a um capsídeo tendo proteínas vp1 de AAV, proteínas vp2 de AAV e proteínas vp3 de AAV. Em modalidades particulares, o capsídeo de AAV1 compreende uma razão pré-determinada de proteínas vp1 de AAV, proteínas vp2 de AAV e proteínas vp3 de AAV de cerca de 1:1:10 montados em um capsídeo de icosaedro T1 de 60 proteínas vp totais. Um capsídeo de AAV1 é capaz de empacotar sequências genômicas para formar uma partícula de AAV (por exemplo, um AAV recombinante em que o genoma é um genoma de vetor). Tipicamente, as sequências de ácido nucleico do capsídeo que codificam a mais longa das proteínas vp, ou seja, VP1, são expressas *em trans* durante a produção de um rAAV tendo um capsídeo de AAV1 são descritas, por exemplo, na Patente US

6.759.237, Patente US 7.105.345, Patente US 7.186.552, Patente US 8.637.255 e Patente US 9.567.607, que estão incorporadas neste documento por referência.

[0043] As sequências de codificação do capsídeo não estão presentes no rAAV1.hPGRN final montado. No entanto, tais sequências são utilizadas na produção de um AAV recombinante. Em certas modalidades, a sequência de codificação da capsídeo de AAV1 é qualquer sequência nucleica que codifica a proteína AAV1 VP1 de comprimento total de SEQ ID NO: 26, ou as regiões VP2 ou VP3 das mesmas. Ver, por exemplo, Patente US 6.759.237, Patente US 7.105.345, Patente US 7.186.552, Patente US 8.637.255 e Patente US 9.567.607, que estão incorporadas neste documento por referência. Em certas modalidades, a sequência de codificação do capsídeo de AAV1 é SEQ ID NO: 25. Em algumas modalidades, o capsídeo de AAV1 é uma proteína produzida a partir da sequência de codificação da SEQ ID NO: 25 com ou sem modificação pós-translacional. No entanto, as variantes desta sequência de codificação podem ser modificadas e/ou outras sequências de codificação podem ser retrotraduzidas para um sistema de expressão desejado usando a sequência de aminoácidos AAV1 VP1, AAV1 VP2 e/ou AAV VP3.

[0044] Em certas modalidades, as composições que compreendem AAV1 recombinante têm capsídeos em que AAV1 contém cinco aminoácidos que são altamente desamidados (N57, N383, N512 e N718), com base na numeração da sequência primária do AAV1 VP1 reproduzido em SEQ ID NO: 26.

Modificação de AAV1								
Enzima		Trip-sina	Trip-sina	Trip-sina	Trip-sina	Trip-sina	Trip-sina	Trip-sina
% de cobertura	N+1	97,6	84,2	92,4	87,4	90,4	85,2	88,9
N35+Desamidação	Q	9,5						
~N57+Desamidação	G	100,0	100,0	100,0	92,0	89,3	86,1	85,5

Modificação de AAV1								
Enzima		Trip- sina	Trip- sina	Trip- sina	Trip- sina	Trip- sina	Trip- sina	Trip- sina
~N94+Desamidação	H				2,3	3,7	4,9	2,2
N113+Desamidação	L		5,6					
~N214+Desamidação	N				0,9	0,4	1,0	0,7
~ N223+Desamidação	A	21,4		25,9				
N227+Desamidação	W	4,9		3,1				
~N253+Desamidação	H		29,7					
Q259+Desamidação	I	24,6		14,2				
~N269+Desamidação	D			21,6			5,2	
~N271+Desamidação	H	27,7						
N286+Desamidação	R	5,4		5,2				
~N302+Desamidação	<u>NNN</u>	43,7	48,6	18,8	12,4	28,7	16,3	11,9
~N303+Desamidação	<u>NNN</u>		50,8	19,3				
~N383+Desamidação	G	88,5	86,9	82,5	82,1	84,6	83,4	92,3
~N408+Desamidação	N	58,2	43,2	40,5	30,1	25,7	28,3	22,8
~N451+Desamidação	Q	20,5						
~Q452+Desamidação	S	1,7						
N477+Desamidação	W	4,4	3,1	39,7	1,2	1,3	1,1	1,8
~N496+Desamidação	<u>NNN</u>	1,1		69,9				
N512+Desamidação	G	93,7	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	97,3
N651+Desamidação	T	2,0	2,1	1,6	0,6			
N691+Desamidação	S			57,1				
~N704+Desamidação	Y		9,4					
N718+Desamidação	G	98,7	98,1	98,2	89,5	91,9	92,3	87,4

[0045] Em certas modalidades, AAV1 é caracterizado por uma composição de capsídeo de uma população heterogênea de isoformas de VP que são desamidadas como definido na tabela a seguir, com base na quantidade total de proteínas de VP no capsídeo, como determinado usando espectrometria de massa. Em certas modalidades,

o capsídeo de AAV é modificado em uma ou mais das seguintes posições, nas faixas fornecidas abaixo, como determinado usando espectrometria de massa. Os números de resíduos são baseados na sequência AAV1 publicada, reproduzida em SEQ ID NO: 26.

TABELA A	
Posição do capsídeo AAV1 com base na numeração VP1	%
N35+Desamidação	1-15, 5-10
~N57+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
N113+Desamidação	0-8
~ N223+Desamidação	0-30, 0, 20-28
N227+Desamidação	0, 1-5
~N253+Desamidação	0, 1-35
Q259+Desamidação	0, 10-25
~N269+Desamidação	0-25
~N271+Desamidação	0-25
N286+Desamidação	2-10
~N302+Desamidação	10-50
~N303+Desamidação	0-55
~N383+Desamidação	65-90, 70-95, 80-95, 75 - 100, 80-100, ou 90-100
~N408+Desamidação	30-65
~N451+Desamidação	0-25
~Q452+Desamidação	0-5
N477+Desamidação	0-45
~N496+Desamidação	0-75
N512+Desamidação	75 - 100, 80-100, 90-100
N651+Desamidação	0-3
N691+Desamidação	0, 1-60
~N704+Desamidação	0-10
N718+Desamidação	75 - 100, 80-100, 90-100

[0046] Modificações adequadas incluem aquelas descritas no pa-

rágrafo acima, modulação de desamidação marcada, que está incorporada neste documento. Em certas modalidades, uma ou mais das seguintes posições ou a glicina após o N é modificada como descrito neste documento. Em certas modalidades, um mutante AAV1 é construído em que a glicina após o N na posição 57, 383, 512 e/ou 718 é preservada (ou seja, permanece inalterada). Em certas modalidades, o NG nas quatro posições identificadas na sentença anterior é preservado com a sequência nativa. Os números de resíduos são baseados no AAV1 VP1 publicado, reproduzido em SEQ ID NO: 26. Em certas modalidades, um NG artificial é introduzido em uma posição diferente de uma das posições identificadas na tabela acima.

Vetores rAAV

[0047] Como indicado acima, AAV recombinante com uma capsídeo de AAV1 são os vetores preferidos descritos neste documento para o tratamento de FTD. Em certas modalidades, por exemplo, nos exemplos abaixo (por exemplo, AAVhu68 ou AAV5), outros capsídeos de AAV podem ser usados para gerar um rAAV. Em certas modalidades, um capsídeo de AAV1 pode ser selecionado e um ou mais dos elementos do genoma do vetor compreendendo uma sequência de codificação de hPGRN podem ser substituídos.

[0048] Como usado neste documento, um capsídeo de AAVhu68 refere-se a um capsídeo de como definido em WO 2018/160582, incorporado neste documento por referência. Como descrito neste documento, um rAAVhu68 tem um capsídeo de rAAVhu68 produzido em um sistema de produção expressando capsídeos de um ácido nucleico de AAVhu68 (por exemplo, SEQ ID NO: 30) que codifica a sequência de aminoácidos vp1 de SEQ ID NO: 31 e, opcionalmente, sequências de ácido nucleico adicionais, por exemplo, codificando uma proteína vp 3 sem as regiões exclusivas vp1 e/ou vp2. O rAAVhu68 resultante da produção usando uma única sequência de ácido nucleico vp1 pro-

duz as populações heterogêneas de proteínas vp1, proteínas vp2 e proteínas vp3. Mais particularmente, o capsídeo AAVhu68 contém subpopulações dentro das proteínas vp1, dentro das proteínas vp2 e dentro das proteínas vp3 que têm modificações dos resíduos de aminoácidos previstos em SEQ ID NO: 31. Essas subpopulações incluem, no mínimo, resíduos de asparagina desamidada (N ou Asn). Por exemplo, as asparaginas nos pares asparagina - glicina são altamente desamidadas. Em uma modalidade, a sequência de ácido nucleico de AAVhu68 vp1 tem a sequência de SEQ ID NO: 30 ou uma fita complementar a ela, por exemplo, o mRNA ou tRNA correspondente. Em certas modalidades, as proteínas vp2 e/ou vp3 podem ser expressas adicionalmente ou alternativamente a partir de sequências de ácido nucleico diferentes da vp1, por exemplo, para alterar a razão das proteínas vp em um sistema de expressão selecionado. Em certas modalidades, também é fornecida uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp3 da SEQ ID NO: 31 (cerca de aa 203 a 736) sem a região única de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137) e/ou regiões únicas de vp2 (cerca de aa 1 a cerca de aa 202), ou uma fita complementar às mesmas, o mRNA ou tRNA correspondente (cerca de nt 607 a cerca de nt 2211 de SEQ ID NO: 30). Em certas modalidades, também é fornecida uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos AAVhu68 vp2 da SEQ ID NO: 31 (cerca de aa 138 a 736) sem a região única de vp1 (cerca de aa 1 a cerca de 137), ou uma fita complementar ao mesmo, o mRNA ou tRNA correspondente (nt 411 a 2211 de SEQ ID NO: 30).

[0049] Como usado neste documento, um capsídeo de AAV5 tem uma sequência de aminoácidos predita de SEQ ID NO: 29. Em certas modalidades, o capsídeo de AAV5 é expresso a partir de uma sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO: 28.

[0050] As sequências genômicas que são empacotadas em um

capsídeo de AAV e distribuídas a uma célula hospedeira são tipicamente compostas por, no mínimo, um transgene e suas sequências reguladoras e repetições terminais invertidas de AAV (ITRs). Tanto AAV de fita simples quanto AAV autocomplementar (sc) estão incluídos no rAAV. O transgene é uma sequência de codificação de ácido nucleico, heterólogo às sequências do vetor, que codifica um polipeptídeo, proteína, molécula de RNA funcional (por exemplo, miRNA, inibidor de miRNA) ou outro produto genético de interesse. A sequência de codificação de ácido nucleico está operacionalmente ligada a componentes regulatórios de uma maneira que permite a transcrição, tradução e/ou expressão do transgene em uma célula de um tecido alvo.

[0051] As sequências AAV do vetor compreendem tipicamente as sequências de repetição terminal invertida 5' e 3' de ação cis (Ver, por exemplo, B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). As sequências ITR têm cerca de 145 bp de comprimento. De preferência, substancialmente todas as sequências que codificam as ITRs são utilizadas na molécula, embora algum grau de modificação menor dessas sequências seja permissível. A capacidade de modificar essas sequências ITR está dentro da habilidade na técnica. (Ver, por exemplo, textos como Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); e K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)). Um exemplo de tal molécula empregada na presente invenção é um plasmídeo de "ação cis" contendo o transgene, no qual a sequência do transgene selecionada e os elementos regulatórios associados são flanqueados pelas sequências ITR 5' e 3' AAV. Em uma modalidade, as ITRs são de um AAV diferente do que fornece um capsídeo. Em uma modalidade, as sequências ITR de AAV2. Uma versão abreviada da ITR 5', denominada Δ ITR, foi descrita na qual o sítio de resolução de terminal e sequência-D (trs) são eliminados. Em outras

modalidades, são usadas as ITRs AAV 5'e 3' de comprimento total. No entanto, as ITRs de outras fontes de AAV podem ser selecionadas. Onde a fonte das ITRs é de AAV2 e o capsídeo AAV é de outra fonte de AAV, o vetor resultante pode ser denominado pseudotipado. No entanto, outras configurações desses elementos podem ser adequadas.

[0052] Além dos elementos principais identificados acima para o vetor AAV recombinante, o vetor também inclui elementos de controle convencionais necessários que estão operacionalmente ligados ao transgene de uma maneira que permite sua transcrição, tradução e/ou expressão em uma célula transfectada com o vetor de plasmídeo ou infectado com o vírus produzido pela invenção. Como usado neste documento, sequências "operacionalmente ligadas" incluem ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controle de expressão que agem in trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[0053] Os elementos de controle regulatórios tipicamente contêm uma sequência promotora como parte das sequências de controle de expressão, por exemplo, localizada entre a sequência ITR 5' selecionada e a sequência de codificação. Os promotores constitutivos, promotores reguláveis [ver, por exemplo, WO 2011/126808 e WO 2013/04943], promotores específicos de tecido, ou um promotor responsivo a pistas fisiológicas podem ser utilizados nos vetores descritos neste documento. O(s) promotor(es) podem ser selecionados a partir de fontes diferentes, por exemplo, intensificador/promotor imediato-inicial de citomegalovírus humano (CMV), o intensificador/promotor inicial de SV40, o promotor de poliovírus JC, proteína básica de mielina (MBP) ou promotores de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), promotor associado à latência (LAP) do vírus herpes simplex (HSV-1), promotor de repetição do terminal longo (LTR) do vírus do rouse sar-

coma (RSV), promotor específico de neurônio (NSE), promotor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), hSYN, promotor do hormônio de concentração de melanina (MCH), CBA, promotor de metaloproteína de matriz (MPP) e o promotor de beta-actina de frango. Além de um promotor, um vetor pode conter uma ou mais outras sequências de iniciação, terminação, intensificadoras de transcrição apropriadas, sinais de processamento de RNA eficientes, tais como sinais de emenda e poliadenilação (poliA); sequências que estabilizam o mRNA citoplasmático, por exemplo WPRE; sequências que intensificam a eficiência da tradução (ou seja, sequência de consenso Kozak); sequências que intensificam a estabilidade da proteína; e quando desejado, sequências que intensificam a secreção do produto codificado. Um exemplo de um intensificador adequado é o intensificador de CMV. Outros intensificadores adequados incluem aqueles que são apropriados para as indicações desejadas do tecido alvo. Em uma modalidade, o cassete de expressão compreende um ou mais intensificadores de expressão. Em uma modalidade, o cassete de expressão contém dois ou mais intensificadores de expressão. Esses intensificadores podem ser iguais ou podem diferir uns dos outros. Por exemplo, um intensificador pode incluir um intensificador precoce imediato de CMV. Este intensificador pode estar presente em duas cópias localizadas adjacentes uma na outra. Alternativamente, as cópias duplas do intensificador podem ser separadas por uma ou mais sequências. Em ainda outra modalidade, o cassete de expressão contém ainda um íntron, por exemplo, o íntron de beta-actina de galinha. Outros íntrons adequados incluem aqueles conhecidos na técnica, por exemplo, como são descritos em WO 2011/126808. Exemplos de sequências poliA adequadas incluem, por exemplo, SV40, SV50, hormônio de crescimento bovino (bGH), hormônio de crescimento humano e poliAs sintéticas. Opcionalmente, uma ou mais sequências podem ser seleciona-

das para estabilizar o mRNA. Um exemplo de tal sequência é uma sequência WPRE modificada, que pode ser modificada à montante da sequência poliA e à jusante da sequência de codificação [ver, por exemplo, MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619.

[0054] Em uma modalidade, o genoma do vetor compreende: uma ITR 5' de AAV, um promotor, um intensificador opcional, um íntron opcional, uma sequência de codificação para PGRN(s) humano(s) ou uma proteína de fusão compreendendo o mesmo, um poli A e uma ITR 3' de AAV. Em uma modalidade, o genoma do vetor compreende: uma ITR 5' de AAV, um promotor, um intensificador opcional, um íntron opcional, uma sequência de codificação para PGRN(s) humano(s) ou uma proteína de fusão compreendendo o mesmo, um poli A e uma ITR 3' de AAV. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende: uma ITR 5' de AAV, um promotor, um intensificador opcional, um íntron opcional, uma sequência de codificação huPGRN, um poli A e uma ITR 3' de AAV. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende: uma ITR 5' de AAV2, um promotor EF1a, um intensificador opcional, um promotor opcional, huPGRN, um SV40 poli A e uma ITR 3' de AAV2. Em certas modalidades, o genoma do vetor é ITR 5' de AAV2, promotor UbC, intensificador opcional, íntron opcional, huPGRN, uma SV40 poli A e um ITR 3' de AAV2. Em certas modalidades, o genoma do vetor é ITR 5' de AAV2, promotor CB7, um íntron, huPGRN, um SV40 poli A e um ITR 3' de AAV2. Em certas modalidades, o genoma do vetor é uma ITR 5' de AAV2, promotor CB7, íntron, huPGRN, uma beta globina de coelho poli A e uma ITR 3' de AAV2. Ver, por exemplo, SEQ ID NO: 22 (EF1a.huPGRN.SV40), SEQ ID NO: 23 (UbC.PI.huPGRN.SV40) ou SEQ ID NO: 24 (CB7.CI.hPGRN1.rGB). As sequências de codificação huPGRN são selecionadas a partir daquelas definidas no presente relatório descritivo. Ver, por exemplo, SEQ ID NO: 3 ou uma sequência 95% a 99,9% idêntica à mesma, ou

SEQ ID NO: 4 ou uma sequência 95% a 99,9% idêntica à mesma, ou um fragmento da mesma como definido neste documento. Sequências ilustrativas de elementos de vetor usados nos exemplos abaixo são fornecidas, por exemplo, na SEQ ID NO: 6 (globina de coelho poliA), ITRs de AAV (SEQ ID NO: 7 e 8), promotor de CMV IE humano (SEQ ID NO: 9), Promotor CB (SEQ ID NO: 10), um íntron quimérico (SEQ ID NO: 11), promotor UbC (SEQ ID NO: 12), um promotor EF-1a (SEQ ID NO: 17), um íntron (SEQ ID NO: 13), e um poli A tardio de SV40 (SEQ ID NO: 14). Outros elementos do genoma do vetor ou variações nessas sequências podem ser selecionados para os genomas do vetor para certas modalidades desta invenção.

Produção Vetorial

[0055] Para uso na produção de um vetor viral AAV (*por exemplo*, um AAV recombinante (r)), os cassetes de expressão podem ser transportados em qualquer vetor adequado, *por exemplo*, um plasmídeo que é distribuído a uma célula hospedeira de empacotamento. Os plasmídeos úteis nesta invenção podem ser modificados de modo que sejam adequados para replicação e empacotamento *in vitro* em células procarióticas, células de inseto, células de mamífero, entre outras. As técnicas de transfecção adequadas e as células hospedeiras de empacotamento são conhecidas e/ou podem ser facilmente designadas por um versado na técnica.

[0056] Os métodos para gerar e isolar AAVs adequados para uso como vetores são conhecidos na técnica. *Ver em geral, por exemplo*, Grieger&Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733; e as referências citadas abaixo, cada uma das quais está incorporada neste documento por referência na sua totalidade.

Para empacotar um transgene em vírions, as ITRs são as únicas componentes de AAV necessárias em *cis* no mesmo construto que a molécula de ácido nucleico que contém os cassetes de expressão. Os genes cap e rep podem ser fornecidos in *trans*.

[0057] Em uma modalidade, os cassetes de expressão descritos neste documento são modificados em um elemento genético (*por exemplo*, um plasmídeo de transporte) que transfere as sequências de construto de imunoglobulina transportadas nele para uma célula hospedeira de empacotamento para a produção de um vetor viral. Em uma modalidade, o elemento genético selecionado pode ser distribuído a uma célula de empacotamento de AAV por qualquer método adequado, incluindo transfecção, eletroporação, distribuição de lipossomos, técnicas de fusão de membranas, péletes revestidos com DNA de alta velocidade, infecção viral e fusão de protoplastos. Células de empacotamento de AAV estáveis também podem ser feitas. Alternativamente, os cassetes de expressão podem ser usados para gerar um vetor viral diferente de AAV, ou para a produção de misturas de anticorpos in vitro. Os métodos usados para fazer tais construtos são conhecidos pelos versados na manipulação de ácido nucleico e incluem engenharia genética, engenharia recombinante e técnicas sintéticas. *Ver, por exemplo*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[0058] A expressão "intermediário de AAV" ou "intermediário de vetor de AAV" refere-se a um capsídeo de rAAV montado que não tem as sequências genômicas desejadas empacotadas nele. Eles também podem ser chamados de capsídeo "vazio". Tal capsídeo pode conter nenhuma sequência genômica detectável de um cassete de expressão, ou apenas sequências genômicas parcialmente empacotadas que são insuficientes para atingir a expressão do produto de gene. Esses

capsídeos vazios não são funcionais para transferir o gene de interesse para uma célula hospedeira.

[0059] O vírus adeno-associado recombinante (AAV) descrito neste documento pode ser gerado usando técnicas conhecidas. *Ver, por exemplo*, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Tal método envolve a cultura de uma célula hospedeira que contém uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína do capsídeo de AAV; um gene rep funcional; um cassete de expressão composto de, no mínimo, repetições terminais invertidas (ITRs) de AAV e um transgene; e funções auxiliares suficientes para permitir o empacotamento do cassete de expressão na proteína do capsídeo de AAV. Métodos de geração do capsídeo, portanto, sequências de codificação, e métodos para produção de vetores virais de rAAV foram descritos. *Ver, por exemplo*, Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) e US 2013/0045186A1.

[0060] Em uma modalidade, é fornecida uma cultura de células útil para a produção de um AAV recombinante. Tal cultura de células contém um ácido nucleico que expressa a proteína do capsídeo de AAV na célula hospedeira; uma molécula de ácido nucleico adequada para empacotamento no capsídeo de AAV, por exemplo, um genoma de vetor que contém ITRs de AAV e uma sequência de ácido nucleico não AAV que codifica um produto genético operacionalmente ligado a sequências que direcionam a expressão do produto em uma célula hospedeira; e funções rep de AAV e funções auxiliares de adenovírus suficientes para permitir o empacotamento da molécula de ácido nucleico no capsídeo de AAV recombinante. Em uma modalidade, a cultura de células é composta por células de mamíferos (por exemplo, células 293 de rim embrionário humano, entre outras) ou células de inseto (por exemplo, baculovírus).

[0061] Tipicamente, as funções rep são da mesma fonte de AAV

uma vez que o AAV fornece os ITRs que flanqueiam o genoma do vetor. Nos exemplos neste documento, as ITRs de AAV2 são selecionadas e o rep de AAV2 é usado. A sequência de codificação é reproduzida na SEQ ID NO: 27. Opcionalmente, outras sequências de rep ou outra fonte de rep (e, opcionalmente, outra fonte de ITR) podem ser selecionadas. Por exemplo, o rep pode ser, mas não está limitado a, proteína rep de AAV1, proteína rep de AAV2; ou rep 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep 68/78 e rep 40/52; ou um fragmento dos mesmos; ou outra fonte. Opcionalmente, as sequências de rep e cap estão no mesmo elemento genético na cultura de células. Pode haver um espaçador entre a sequência de rep e o gene cap. Qualquer uma dessas sequências de capsídeo de AAV ou AAV mutante pode estar sob o controle de sequências de controle reguladoras exógenas que direcionam expressão das mesmas em uma célula hospedeira.

[0062] Em uma modalidade, as células são fabricadas em uma cultura de células adequadas (por exemplo, células HEK 293). Os métodos para fabricar os vetores de terapia genética aqui descritos incluem métodos bem conhecidos na técnica, tais como geração de DNA de plasmídeo utilizado para a produção dos vetores de terapia genética, geração vetorial e purificação vetorial. Em algumas modalidades, o vetor de terapia genética é um vetor AAV e os plasmídeos gerados são um plasmídeo cis de AAV que codifica o genoma de AAV e o gene de interesse, um plasmídeo trans de AAV contendo genes rep e cap de AAV e um plasmídeo auxiliar de adenovírus. O processo de geração de vetor pode incluir etapas do método, tais como iniciação de cultura de célula, passagem de células, semeadura de células, transfecção de células com o DNA de plasmídeo, troca de meio pós-transfecção para meio sem soro e colheita de células e meios de cultura contendo vetor.

[0063] Em certas modalidades, o processo de fabricação de rA-

AV.hPGRN envolve a transfecção transiente de células HEK293 com DNA de plasmídeo. Um único lote ou vários lotes são produzidos por transfecção tripla mediada por PEI de células HEK293 em biorreatores PALL iCELLis. O material de AAV colhido é purificado sequencialmente por clarificação, TFF, cromatografia de afinidade e cromatografia de troca aniônica em sistemas de bioprocessamento fechados descartáveis, onde possível.

[0064] As células e os meios de cultura contendo vetor colhidos são referidos neste documento como colheita de célula bruta. Ainda em outro sistema, os vetores de terapia genética são introduzidos em células de inseto por infecção com vetores baseados em baculovírus. Para revisões nestes sistemas de produção, ver geralmente, por exemplo, Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production", Human Gene Therapy 20:922-929, o conteúdo de cada um dos quais está incorporado neste documento por referência na sua totalidade. Métodos de produção e utilização destes e outros sistemas de produção de AAV são também descritos nas seguintes Patentes U.S., o conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência na sua totalidade: 5.139.941; 5.741.683; 6.057.152; 6.204.059; 6.268.213; 6.491.907; 6.660.514; 6.951.753; 7.094.604; 7.172.893; 7.201.898; 7.229.823; e 7.439.065, que estão incorporados neste documento por referência.

[0065] A colheita de célula bruta pode depois ser submetida a etapas do método, tais como concentração da colheita do vetor, diafiltração da colheita do vetor, microfluidização da colheita do vetor, digestão por nuclease da colheita do vetor, filtração do intermediário microfluidizado, purificação bruta por cromatografia, purificação bruta por ultracentrifugação, troca de tampão por filtração de fluxo tangencial e/ou formulação e filtração para preparar o vetor em massa.

[0066] Uma purificação por cromatografia de afinidade em duas etapas em alta concentração de sal seguida por cromatografia em resina de troca aniônica é usada para purificar o produto de fármaco do vetor e remover os capsídeos vazios. Esses métodos são descritos em mais detalhes na Pedido de Patente Internacional No. PCT/US2016/065970, depositado em 9 de dezembro de 2016, que está incorporado neste documento por referência. Métodos de purificação para AAV8, Pedido de Patente Internacional No. PCT/US2016/065976, depositado em 9 de dezembro de 2016, e rh10, Pedido de Patente Internacional No. PCT/US16/66013, depositado em 9 de dezembro de 2016, intitulado "Scalable Purification Method for AAVrh10", também apresentado em 11 de dezembro de 2015, e para AAV1, Pedido de Patente Internacional No. PCT/US2016/065974, depositado em 9 de dezembro de 2016, para "Scalable Purification Method for AAV1", depositado em 11 de dezembro de 2015, estão todos incorporados por referência neste documento.

[0067] Para calcular o teor de partículas vazias e cheias, os volumes da banda VP3 para uma amostra selecionada (*por exemplo*, em exemplos neste documento, uma preparação purificada por gradiente de iodixanol onde # de GC = # de partículas) são representados graficamente contra partículas de GC carregadas. A equação linear resultante ($y = mx + c$) é usada para calcular o número de partículas nos volumes de banda dos picos do artigo de teste. O número de partículas (pt) por 20 μ L carregado é, então, multiplicado por 50 para dar partículas (pt)/mL. Pt/mL dividido por GC/mL dá a razão de partículas para cópias do genoma (pt/GC). Pt/mL-GC/mL dá pt/mL vazio. O pt/mL vazio dividido por pt/mL e x 100 dá a porcentagem de partículas vazias.

[0068] Geralmente, os métodos para ensaiar capsídeos e partículas de vetor AAV vazios com genomas empacotados são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999)

6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Para testar o capsídeo desnaturado, os métodos incluem submeter o estoque de AAV tratado a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, consistindo em qualquer gel capaz de separar as três proteínas do capsídeo, por exemplo, um gradiente de gel contendo Tris-acetato a 3-8% no tampão, depois correr o gel até o material da amostra ser separado, e transferir o gel para as membranas de náilon ou nitrocelulose, de preferência náilon. Os anticorpos de capsídeo anti-AAV são então usados como anticorpos primários que se ligam a proteínas de capsídeo desnaturadas, preferivelmente um anticorpo monoclonal de capsídeo anti-AAV, mais preferencialmente o anticorpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). Um anticorpo secundário é, então, usado, um que se liga ao anticorpo primário e contém um meio para detectar ligação com o anticorpo primário, mais preferencialmente, um anticorpo anti-IgG contendo uma molécula de detecção ligada covalentemente a este, mais preferencialmente um anticorpo de ovelha anti-IgG de camundongo ligado covalentemente a peroxidase de rábano. Um método para detectar a ligação é usado para determinar semiquantitativamente a ligação entre os anticorpos primário e secundário, preferivelmente um método de detecção capaz de detectar emissões de isótopos radioativos, radiação eletromagnética ou trocas colorimétricas, mais preferivelmente um kit de detecção de quimiluminescência. Por exemplo, para SDS-PAGE, amostras das frações da coluna podem ser tomadas e aquecidas em tampão de carregamento de SDS-PAGE contendo agente de redução (*por exemplo*, DTT) e proteínas do capsídeo foram resolvidas em géis de poliacrilamida pré-moldados (*por exemplo*, Novex). O manchamento com prata pode ser realizado usando o SilverXpress (Invitrogen, CA) de acordo com as instruções do fabricante ou outro método de manchamento adequado, por exemplo, manchas de rubi ou coomassie SYPRO. Numa modali-

dade, a concentração de genomas vetoriais de AAV (vg) em frações da coluna pode ser medida por PCR quantitativa em tempo real (Q-PCR). As amostras são diluídas e digeridas com DNase I (ou outra nuclease adequada) para remover o DNA exógeno. Após a inativação da nuclease, as amostras são posteriormente diluídas e amplificadas utilizando iniciadores e uma sonda fluorogênica TaqMan™ específica para a sequência de DNA entre os iniciadores. O número de ciclos necessários para atingir um nível definido de fluorescência (ciclo de limiar, Ct) é medido para cada amostra em um Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System. DNA plasmídico contendo sequências idênticas às contidas no vetor AAV é empregado para gerar uma curva padrão na reação Q-PCR. Os valores do limiar do ciclo (Ct) obtidos a partir das amostras são utilizados para determinar o título do genoma vetorial normalizando-o ao valor Ct da curva padrão do plasmídeo. Ensaios de ponto final baseados na PCR digital também podem ser usados.

[0069] Em um aspecto, é usado um método de q-PCR otimizado que utiliza uma serina protease de amplo espectro, por exemplo, proteinase K (tal como é comercialmente disponível na Qiagen). Mais particularmente, o ensaio titulador de genoma qPCR otimizado é semelhante a um ensaio padrão, exceto que após a digestão com DNase I, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K e tratadas com proteinase K seguida de inativação por calor. Adequadamente, as amostras são diluídas com tampão de proteinase K em uma quantidade igual ao tamanho da amostra. O tampão de proteinase K pode ser concentrado até 2 vezes ou mais. Tipicamente, o tratamento com proteinase K é de cerca de 0,2 mg/mL, mas pode variar entre 0,1 mg/mL e cerca de 1 mg/mL. A etapa de tratamento é geralmente conduzida a cerca de 55°C durante cerca de 15 minutos, mas pode ser realizada a uma temperatura mais baixa (por exemplo, cerca de 37°C a cerca de

50°C) durante um período de tempo mais longo (por exemplo, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos), ou uma temperatura mais alta (por exemplo, até cerca de 60°C) por um período de tempo mais curto (por exemplo, cerca de 5 a 10 minutos). Similarmente, a inativação do calor é geralmente, a cerca de 95°C durante cerca de 15 minutos, mas a temperatura pode ser diminuída (por exemplo, cerca de 70 a cerca de 90°C) e o tempo prolongado (por exemplo, cerca de 20 minutos a cerca de 30 minutos). As amostras são então diluídas (por exemplo, 1.000 vezes) e submetidas à análise TaqMan como descrito no ensaio padrão.

[0070] Adicionalmente, ou alternativamente, a PCR digital de gotícula (ddPCR) pode ser usada. Por exemplo, foram descritos métodos para determinar títulos do genoma de vetores de AAV de fita simples e autocomplementares por ddPCR. Ver, por exemplo, M. Lock et al, *Hum Gene Therapy Methods*, *Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

[0071] Em suma, o método para separar partículas de rAAV com sequências genômicas embaladas de intermediários de AAV deficientes em genoma envolve submeter uma suspensão compreendendo partículas virais sw AAV recombinantes e intermediários de capsídeo de AAV à cromatografia líquida de rápido desempenho, em que as partículas virais de AAV e os intermediários de AAV estão ligados a uma resina de troca aniônica forte equilibrada a um pH alto e submetidos a um gradiente de sal enquanto monitoram o eluato quanto à absorbância ultravioleta em cerca de 260 e cerca de 280. O pH pode ser ajustado dependendo do AAV selecionado. Ver, por exemplo, WO2017/160360 (AAV9), WO2017/100704 (AAVrh10), WO 2017/100676 (por exemplo, AAV8) e WO 2017/100674 (AAV1), que estão incorporados neste documento por referência. Neste método, os capsídeos completos de AAV são coletados a partir de uma fração que

é eluída quando a razão de A260/A280 atinge um ponto de inflexão. Em um exemplo, para a etapa de Cromatografia de Afinidade, o produto diafiltrado pode ser aplicado a uma resina de afinidade Capture Select™ Poros- AAV2/9 (Life Technologies) que captura com eficiência o sorotipo AAV2. Nessas condições iônicas, uma porcentagem significativa de DNA e proteínas celulares residuais escoam através da coluna, enquanto as partículas do AAV são capturadas com eficiência.

Composições

[0072] São fornecidas neste documento composições contendo pelo menos um estoque de rAAV.hPGRN (por exemplo, um estoque de rAAV) e um carreador, excipiente e/ou conservante opcionais. Um estoque de rAAV refere-se a uma pluralidade de vetores de rAAV que são iguais, por exemplo, tais como nas quantidades descritas abaixo na discussão de concentrações e unidades de dosagem.

[0073] Em certas modalidades, uma composição compreende um estoque de vírus que é um AAV recombinante (rAAV) adequado para uso no tratamento de demência temporal frontal relacionada à progranulina (FTD), o dito rAAV compreendendo: (a) um capsídeo de vírus adeno-associado 1, e (b) um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina. Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende um promotor, um intensificador, um íntron, uma sequência de codificação de PGRN humano e um sinal de poliadenilação. Em certas modalidades, o íntron consiste em um doador de splice de beta actina de frango e um elemento aceitor de splice de coelho β . Em certas modalidades, o genoma do vetor compreende ainda um ITR 5' de AAV2 e um ITR 3' de AAV2 que flanqueiam todos os elementos do genoma do vetor.

[0074] O rAAV.hPGRN, preferivelmente suspenso em um carreador fisiologicamente compatível, pode ser administrado a um paciente mamífero humano ou não humano. Em certas modalidades, para administração a um paciente humano, o rAAV é adequadamente suspenso em uma solução aquosa contendo salina, um tensoativo e um sal ou mistura de sais fisiologicamente compatível. Adequadamente, a formulação é ajustada a um pH fisiologicamente aceitável, por exemplo, na faixa de pH 6 a 9, ou pH 6,5 a 7,5, pH 7,0 a 7,7 ou pH 7,2 a 7,8. Uma vez que o pH do líquido cefalorraquidiano é de cerca de 7,28 a cerca de 7,32, ou um pH de 7,2 a 7,4 para distribuição intratecal, um pH dentro dessa faixa pode ser desejado; enquanto para distribuição intravenosa, um pH de cerca de 6,8 a cerca de 7,2 pode ser desejado. No entanto, outros pHs dentro das faixas mais amplas e essas subfaixas podem ser selecionados para outra via de distribuição.

[0075] Em certas modalidades, a formulação pode conter uma solução aquosa salina tamponada que não compreende bicarbonato de sódio. Tal formulação pode conter uma solução aquosa salina tamponada compreendendo um ou mais de fosfato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e misturas dos mesmos, em água, tal como um tampão de Harvard. A solução aquosa pode ainda conter Kolliphor® P188, um poloxâmero que é comercialmente disponível na BASF que foi anteriormente vendido com o nome comercial Lutrol® F68. A solução aquosa pode ter um pH de 7,2 ou um pH de 7,4.

[0076] Em outra modalidade, a formulação pode conter uma solução aquosa salina tamponada compreendendo Fosfato de Sódio 1 mM (Na_3PO_4), cloreto de sódio 150 mM (NaCl), cloreto de potássio 3 mM (KCl), cloreto de cálcio 1,4 mM (CaCl_2), cloreto de magnésio 0,8 mM (MgCl_2) e 0,001% de Kolliphor® 188. Ver, por exemplo, harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html. Em certas modalida-

des, o tampão de Harvard é preferido.

[0077] Em outras modalidades, a formulação pode conter um ou mais intensificadores de permeação. Exemplos de intensificadores de permeação adequados podem incluir, por exemplo, manitol, glicocolato de sódio, taurocolato de sódio, desoxicolato de sódio, salicilato de sódio, caprilato de sódio, caprato de sódio, lauril sulfato de sódio, éter polioxietileno-9-laurel ou EDTA.

[0078] Em outra modalidade, a composição inclui um carreador, diluente, excipiente e/ou adjuvante. Os carreadores adequados podem ser facilmente selecionados por um versado na técnica, tendo em vista a indicação para a qual o vírus de transferência é direcionado. Por exemplo, um carreador adequado inclui salina, que pode ser formulada com uma variedade de soluções de tamponamento (por exemplo, salina tamponada com fosfato). Outros carreadores exemplificativos incluem salina estéril, lactose, sacarose, fosfato de cálcio, gelatina, dextrano, ágar, pectina, óleo de amendoim, óleo de gergelim e água. O tampão/carreador deve incluir um componente que impeça a aderência do rAAV ao tubo de infusão, mas não interfira com a atividade de ligação do rAAV in vivo.

[0079] Opcionalmente, as composições podem conter, além do rAAV e do(s) carreador(es), outros ingredientes farmacêuticos convencionais, tais como conservantes ou estabilizadores químicos. Conservantes exemplificativos adequados incluem clorobutanol, sorbato de potássio, ácido sórbico, dióxido de enxofre, propil galato, parabenos, etil vanilina, glicerina, fenol e paraclorofenol. Estabilizadores químicos adequados incluem gelatina e albumina.

[0080] Como usado neste documento, "carreador" inclui todo e qualquer solvente, meio de dispersão, veículos, revestimentos, diluentes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de retardamento de absorção, tampões, soluções carreadoras, suspen-

sões, coloides e semelhantes. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Ingredientes ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. A frase "farmacêuticamente aceitável" refere-se a entidades e composições moleculares que não produzem uma reação indesejável alérgica ou semelhante quando administradas a um hospedeiro. Os veículos de distribuição, tais como lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lipídio, vesículas e semelhantes, podem ser usados para a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras adequadas. Em particular, os transgenes distribuídos por vetor de rAAV pode ser formulado para distribuição tanto encapsulado em uma partícula de lipídio, um lipossoma, uma vesícula, uma nanoesfera quanto uma nanopartícula ou semelhante.

[0081] Em uma modalidade, uma composição inclui uma formulação final adequada para distribuição a um sujeito, por exemplo, é uma suspensão líquida aquosa tamponada a um pH e concentração de sal fisiologicamente compatíveis. Opcionalmente, um ou mais tensoativos estão presentes na formulação. Em outra modalidade, a composição pode ser transportada como um concentrado que é diluído para administração a um sujeito. Em outras modalidades, a composição pode ser liofilizada e reconstituída no momento da administração.

[0082] Um tensoativo adequado, ou combinação de tensoativos, pode ser selecionado de tensoativos não iônicos que não são tóxicos. Em uma modalidade, um tensoativo de copolímero em bloco difuncional que termina em grupos hidroxil primários é selecionado, por exemplo, como Pluronic® F68 [BASF], também conhecido como Poloxâmero 188, que tem um pH neutro, tem um peso molecular médio de 8.400. Outros tensoativos e outros poloxâmeros podem ser selecionados, ou seja, copolímeros triblocos não iônicos compostos de uma

cadeia hidrofóbica central de polioxipropileno (poli(óxido de propileno)) flanqueada por duas cadeias hidrofílicas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Macrogol-15 Hidroxiestearato), LABRASOL (Glicerídeo polioxi caprílico), éter oleílico de polióxi 10, TWEEN (ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitano), etanol e polietileno glicol. Em uma modalidade, a formulação contém um poloxâmero. Estes copolímeros são comumente nomeados com a letra "P" (para poloxâmero) seguidos de três dígitos: os dois primeiros dígitos x 100 dão a massa molecular aproximada do núcleo de polioxipropileno, e o último dígito x 10 indica o percentual de polioxietileno. Em uma modalidade, o Poloxâmero 188 é selecionado. O tensoativo pode estar presente em uma quantidade até cerca de 0,0005% a cerca de 0,001% da suspensão.

[0083] Os vetores são administrados em quantidades suficientes para transfectar as células e fornecer níveis suficientes de transferência e expressão genética para fornecer um benefício terapêutico sem efeitos adversos indevidos, ou com efeitos fisiológicos medicamente aceitáveis, que podem ser determinados pelos versados nas técnicas médicas. Opcionalmente, outras vias sem ser a administração intratecal podem ser usadas, tais como, por exemplo, distribuição direta a um órgão desejado (*por exemplo*, o fígado (opcionalmente através da artéria hepática), pulmão, coração, olho, rim), administração oral, por inalação, intranasal, intratraqueal, intra-arterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica e outras vias parentais. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

[0084] As dosagens do vetor viral dependerão principalmente de fatores tais como a condição a ser tratada, a idade, o peso e a saúde do paciente e, portanto, podem variar entre os pacientes. Por exemplo, uma dosagem humana terapeuticamente eficaz do vetor viral é geralmente na faixa de cerca de 25 a cerca de 1.000 microlitros a cerca de

100 mL de solução contendo concentrações de cerca de 1×10^9 a 1×10^{16} genomas do vetor de vírus (para tratar um sujeito médio de 70 kg em peso corporal) incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa, e preferivelmente $1,0 \times 10^{12}$ GC a $1,0 \times 10^{14}$ GC para um paciente humano. Em uma modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , ou 9×10^9 GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , ou 9×10^{10} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , ou 9×10^{11} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , ou 9×10^{12} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , ou 9×10^{13} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , ou 9×10^{14} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa. Em outra modalidade, as composições são formuladas para conter pelo menos 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , ou 9×10^{15} GC incluindo todos os números inteiros ou quantidades fracionárias dentro da faixa. Em uma modalidade, para a aplicação em humano, a dose pode variar de 1×10^{10} a cerca de

1×10^{12} GC por dose, incluindo todos os números inteiros ou frações dentro da faixa.

[0085] Em certas modalidades, a dose é na faixa de cerca de 1×10^9 GC /g de massa cerebral a cerca de 1×10^{12} GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é na faixa de cerca de 1×10^{10} GC /g de massa cerebral a cerca de $3,33 \times 10^{11}$ GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é na faixa de cerca de $3,33 \times 10^{11}$ GC /g de massa cerebral a cerca de $1,1 \times 10^{12}$ GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é na faixa de cerca de $1,1 \times 10^{12}$ GC /g de massa cerebral a cerca de $3,33 \times 10^{13}$ GC /g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é inferior a $3,33 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é inferior a $1,1 \times 10^{12}$ GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é inferior a $3,33 \times 10^{13}$ GC/g de massa cerebral.

[0086] Em certas modalidades, a dose é de cerca de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 2×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 2×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 3×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 4×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 5×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 6×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 7×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 8×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 9×10^{10} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 1×10^{11} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 2×10^{11} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 3×10^{11} GC/g de massa cerebral. Em certas modalidades, a dose é de cerca de 4×10^{11} GC/g de

massa cerebral.

[0087] Em certas modalidades, a dose é administrada a humanos como uma dose fixa na faixa de cerca de $1,44 \times 10^{13}$ a $4,33 \times 10^{14}$ GC do rAAV. Em certas modalidades, a dose é administrada a humanos como uma dose fixa na faixa de cerca de $1,44 \times 10^{13}$ a 2×10^{14} GC do rAAV. Em certas modalidades, a dose é administrada a humanos como uma dose fixa na faixa de cerca de 3×10^{13} a 1×10^{14} GC do rAAV. Em certas modalidades, a dose é administrada a humanos como uma dose fixa na faixa de cerca de 5×10^{13} a 1×10^{14} GC do rAAV.

[0088] Em algumas modalidades, as composições podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de AAV que é na faixa de cerca de 1×10^{13} a 8×10^{14} GC do rAAV. Em algumas modalidades, as composições podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de rAAV que é na faixa de cerca de $1,44 \times 10^{13}$ a $4,33 \times 10^{14}$ GC do rAAV. Em algumas modalidades, as composições podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de rAAV que é na faixa de cerca de 3×10^{13} a 1×10^{14} GC do rAAV. Em algumas modalidades, as composições podem ser formuladas em unidades de dosagem para conter uma quantidade de rAAV que é na faixa de cerca de 5×10^{13} a 1×10^{14} GC do rAAV.

[0089] Em certas modalidades, o rAAV é administrado a um sujeito em uma dose única. Em certas modalidades, doses múltiplas (por exemplo 2 doses) são desejadas.

[0090] A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e essas dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o vetor recombinante é empregado. Os níveis de expressão do transgene podem ser monitorados para determinar a frequência de dosagem resultando em vetores virais, preferivelmente vetores de AAV contendo o

minigene. Opcionalmente, regimes de dosagem semelhantes aos descritos para fins terapêuticos podem ser utilizados para imunização usando as composições da invenção.

[0091] Como usados neste documento, os termos "distribuição intratecal" ou "administração intratecal" referem-se a uma via de administração para fármacos por meio de uma injeção no canal espinhal, mais especificamente no espaço subaracnoide de modo que atinja o líquido cefalorraquidiano (CSF). A distribuição intratecal pode incluir punção lombar, intraventricular (incluindo intracerebroventricular (ICV)), sub-occipital/intracisterna e/ou punção em C1-2. Por exemplo, o material pode ser introduzido para difusão através do espaço subaracnoide por meio de punção lombar. Em outro exemplo, a injeção pode ser na cisterna magna ou meio de distribuição intraparenquimal. Em certas modalidades, o rAAV é administrado por meio de uma injeção sub-occipital guiada por tomografia computadorizada (CT-) na cisterna magna (intracisterna magna). Em certas modalidades, o paciente é administrado com uma dose única.

[0092] Como usados neste documento, os termos "distribuição intracisterna" ou "administração intracisterna" referem-se a uma via de administração de fármacos diretamente no líquido cefalorraquidiano da cisterna magna cerebelomedular, mais especificamente por meio de uma punção sub-occipital ou por injeção direta na cisterna magna ou por meio de tubo permanentemente posicionado.

[0093] Em certas modalidades, o estoque de rAAV.hPGRN é formulado em tampão de formulação final intratecal (ITFFB; CSF artificial com 0,001% de Pluronic F-68). O lote ou lotes são congelados, subsequentemente descongelados, agrupados se necessário, ajustados à concentração alvo, esterilizados por filtração através de um filtro de 0,22 µm e os frascos são preenchidos. Em certas modalidades, a suspensão que compreende o tampão de formulação rAAV1.hPGRN é

ajustada a um pH de 7,2 a 7,4.

[0094] Em uma modalidade, os volumes para distribuição das doses de rAAV1.hPGRN fornecidos neste documento e as concentrações podem ser determinados por um versado na técnica. Por exemplo, volumes de cerca de 1 μ L a 150 mL podem ser selecionados, com os volumes mais altos sendo selecionados para adultos. Tipicamente, para recém-nascidos um volume adequado é de cerca de 0,5 mL a cerca de 10 mL, para bebês mais velhos podem ser selecionados cerca de 0,5 mL a cerca de 15 mL. Para crianças pequenas, um volume de cerca de 0,5 mL a cerca de 20 mL pode ser selecionado. Para crianças, volumes de até 30 mL podem ser selecionados. Para pré-adolescentes e adolescentes, volumes de até 50 mL podem ser selecionados. Ainda em outras modalidades, um paciente pode receber uma administração intratecal em um volume de cerca de 5 mL a cerca de 15 mL são selecionados, ou cerca de 7,5 mL a cerca de 10 mL. Outros volumes e dosagens adequados podem ser determinados. A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais e essas dosagens podem variar dependendo da aplicação terapêutica para a qual o vetor recombinante é empregado.

[0095] Em certas modalidades, uma composição compreende: rAAV.EF1a.huPGRN.SV40, rAAV.UbC.PI.huPGRN.SV40 ou rAAV.VCB7.CI.hPGRN1.rGB. As composições nas quais o capsídeo do rAAV é AAVhu68, AAV5 ou AAV1 são ilustradas nos exemplos abaixo. Em modalidades particularmente preferidas, o rAAV é AAV1. Em certas modalidades, as sequências de codificação huPGRN são selecionadas a partir daquelas definidas no presente relatório descritivo. Ver, por exemplo, SEQ ID NO: 3 ou uma sequência 95% a 99,9% idêntica à mesma, ou SEQ ID NO: 4 ou uma sequência 95% a 99,9% idêntica à mesma, ou um fragmento da mesma como definido neste documento.

Sequências ilustrativas de elementos de vetor usados nos exemplos abaixo são fornecidas, por exemplo, na SEQ ID NO: 6 (globina de coelho poliA), ITRs de AAV (SEQ ID NO: 7 e 8), promotor de CMV IE humano (SEQ ID NO: 9), Promotor CB (SEQ ID NO: 10), um íntron quimérico (SEQ ID NO: 11), promotor UbC (SEQ ID NO: 12), um promotor EF-1a (SEQ ID NO: 17), um íntron (SEQ ID NO: 13), e um poli A tardio de SV40 (SEQ ID NO: 14).

Usos

[0096] Como usado neste documento, uma haploinsuficiência de PGRN refere-se a pacientes com uma mutação no gene PGRN, que resulta em PGRN e deficiente e/ou níveis de GRN(s) deficiente(s). A população alvo para uma terapia com rAAV1-PGRN inclui pacientes que têm uma haploinsuficiência de PGRN e/ou pacientes que de outra forma têm PGRN deficiente ou níveis de GRN deficientes. Em certas modalidades, o paciente é heterozigoto para uma mutação de PGRN. Ainda em outra modalidade, o paciente é homozigoto de uma mutação de PGRN. Em certas modalidades, o paciente é administrado com um regime de imunossupressão em combinação com a terapia de hPGRN mediada por rAAV1 fornecida neste documento.

[0097] Em certas modalidades, o rAAV1.PGRN é útil no tratamento de pacientes com haploinsuficiência de GRN. Esses pacientes podem ter sido diagnosticados com neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de GRN ou podem ser pré-sintomáticos. O rAAV1.PGRN pode ser administrado como uma dose única por meio de uma injeção sub-occipital guiada por tomografia computadorizada (CT-) na cisterna magna (intracisterna magna [ICM]). Uma única dose é administrada em um nível de dose predeterminado. A transdução cerebral superior alcançada com uma única injeção de ICM em NHPs resultou na seleção desta via de administração. Em certas modalidades, a administração do vetor no ICM também resulta em

respostas de células T anti-PGRN reduzidas em comparação com outra via de administração (por exemplo, injeção no ventrículo lateral). Como um procedimento comum, a injeção de ICM (também conhecida como punção sub-occipital) foi suplantada anteriormente pela punção lombar. No entanto, outros níveis de dosagem e vias de administração podem ser selecionados e/ou usados em combinação com esta terapia de hPGRN mediada por rAAV1.

[0098] Em certas modalidades, a terapia mediada por rAAV1 descrita neste documento pode fornecer a expressão de PGRN em níveis fisiológicos médios normais para um humano sem uma mutação de GRN (haploinsuficiência). No entanto, o tratamento pode fornecer efeito terapêutico mesmo se o aumento na expressão de PGRN estiver abaixo dos níveis normais, fornecendo cerca de 40% a 99% dos níveis médios normais, por exemplo, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou outros valores entre essas faixas. Em certas modalidades, isso pode resultar de um nível elevado de PGRN de pelo menos 5% a cerca de 70%, ou mais, acima dos níveis de expressão do paciente antes do tratamento. Em certas modalidades, o tratamento fornece eficácia terapêutica onde a administração de hPGRN mediado por rAAV1 resulta em níveis elevados de PGRN no CSF (por exemplo, 10 vezes a 40 vezes mais altos do que os níveis normais).

[0099] Em certas modalidades, a eficácia é avaliada por um ou mais dos seguintes: níveis aumentados de proteína PGRN no CSF e/ou mudanças na espessura cortical do cérebro. Em certas modalidades, a eficácia da terapia mediada por rAAV1 é avaliada após a administração de uma única dose de ICM medida por um ou mais de: sobrevivência prolongada e melhora dos sintomas clínicos e funcionamento diário como avaliado pelo Mini-Mental State Exam (MMSE), Clinical Global Impression of Change (CGI-C), Frontal Assessment Battery (FAB),

Frontotemporal Dementia Rating Scale (FRS), Frontal Behavioral Inventory (FBI), Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), teste de fluência verbal, Clinical Dementia Rating for Frontotemporal Lobar Degeneration Sum of Boxes (CDR-FTLD sb), and/or Neuropsychiatric Inventory (NPI). Em certas modalidades, a eficácia é demonstrada pela melhoria nos níveis de CSF de cadeia leve de neurofilamento (NFL), tau, tau fosforilada e marcadores inflamatórios e/ou níveis plasmáticos aumentados de PGRN. Em certas modalidades, a eficácia é avaliada medindo uma redução ou reversão nos níveis de microgliose.

[00100] Em certas modalidades, a eficácia é medida pela melhora em um ou mais dos sintomas clínicos associados a pacientes com GRN, incluindo, por exemplo, déficits comportamentais (desinibição, apatia, perda de simpatia ou empatia, comportamentos compulsivos ou estereotipados ou hiperoralidade) e déficits cognitivos (declínio na função executiva sem um impacto significativo na memória episódica ou nas habilidades visual-espaciais).

[00101] Em certas modalidades, a melhoria é observada em alguns outros sintomas mais atípicos, incluindo características psiquiátricas (delírios, alucinações e comportamentos obsessivos) e/ou outros déficits cognitivos (comprometimento da memória episódica, apraxia e disfunção visual-espacial). A avaliação pode ser realizada usando os critérios FTDC pode ser avaliada, incluindo imagens do cérebro para sinais de degeneração frontal e/ou temporal, uma avaliação de declínio em uma escala de classificação clínica (tal como a Avaliação Clínica de Demência para Degeneração Lobar Frontotemporal [CDR-FTLD], Inventário de Comportamento Frontal [FBI], Inventário de Neuropsiquiátrico [NPI] e Escala de Classificação de Demência Frontotemporal [FRS]) e, em última análise, testes genéticos para confirmar uma mutação de GRN patogênica. Podem ser usados biomarcadores do fluido

cefalorraquidiano (CSF), incluindo tau e β -amiloide, bem como imagens de tomografia por emissão de pósitrons de amiloide (PET).

[00102] Em certas modalidades, a melhora é observada em portadores de mutação *GRN* com afasia progressiva primária (PPA), que é caracterizada por sintomas relacionados à fala e linguagem. Eles podem ser diagnosticados usando diretrizes baseadas nos critérios do Mesulam, que distinguem três variantes clínicas do PPA: variante semântica PPA (svPPA), variante não fluente PPA (nfvPPA) e variante logopênica PPA (lvPPA) (Gorno-Tempini et al., (2011). "Classification of primary progressive aphasia and its variants." *Neurology*. 76(11):1006-14). O nfvPPA apresenta déficits na capacidade de produzir fala e as características principais incluem agramatismo na produção da linguagem, fala com esforço e apraxia da fala. O svPPA apresenta déficits na habilidade de entender o significado das palavras, e as principais características incluem dificuldade na nomeação de palavras e compreensão de uma única palavra. O lvPPA é caracterizado pela dificuldade em encontrar as palavras adequadas ao falar e não é acompanhado por um declínio na compreensão das palavras. As principais características do lvPPA são déficits na recuperação de palavras e na capacidade de repetir frases. Carreadores da mutação de *GRN* mais comumente apresentam com nfvPPA; no entanto, eles podem ter sintomas mais amplos abrangendo o espectro clínico do PPA, resultando em um diagnóstico de "PPA - não especificado de outra forma" (Gorno-Tempini et al., 2011; Woollacott and Rohrer, 2016).

[00103] É fornecido um método de tratamento de um paciente humano com uma condição neurodegenerativa associada à haploinsuficiência de *GRN*. Em certas modalidades, esta condição é demência frontotemporal relacionada à progranulina (FTD). O método compreende administrar uma sequência de codificação para uma progranulina ao sistema nervoso central (SNC) por meio de um vírus ade-

no-associado recombinante (rAAV) tendo um capsídeo de vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana, e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

[00104] É fornecido um método para tratar um paciente humano com lesões cerebrais associadas à demência temporal frontal relacionada à progranulina ou outra condição neurodegenerativa associada à haploinsuficiência de GRN. O método uma sequência de codificação para uma progranulina ao sistema nervoso central (SNC) por meio de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) tendo um capsídeo de vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana, e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

[00105] Em certas modalidades, os métodos fornecidos neste documento podem compreender ainda monitorar o tratamento por (a) avaliação de forma não invasiva do paciente quanto à redução nas lesões de armazenamento da retina como um preditor de redução de lesões do cérebro, (b) realização de imagens de ressonância magnética para avaliar o volume do cérebro e/ou (c) medição da concentração de progranulina no CSF. Opcionalmente, a concentração de progranulina no plasma pode ser avaliada.

[00106] Em certas modalidades, a eficácia de uma composição de rAAV.hPGRN é avaliada por um ou mais dos seguintes métodos basicamente cognitivos, basicamente comportamentais ou cognitivos/outras. O seguinte descreve avaliações adequadas.

[00107] As avaliações basicamente cognitivas incluem testes de

fluência verbal, taxa de demência clínica para FTLD ou miniexame do estado mental (MMSE). O teste de fluência verbal provavelmente será conduzido apresentando a mesma figura/fotografia para cada sujeito e solicitando uma descrição verbal. Durante a descrição, a taxa de fala (palavras/minuto) será contada, registrada e, finalmente, comparada às taxas refletivas de adultos neurotípicos. O CDR - FTLD é uma versão estendida do CDR clássico, que é historicamente usado para classificar a gravidade dos distúrbios do espectro da doença de Alzheimer. A avaliação inclui os 6 domínios originais do CDR (memória, orientação, julgamento e solução de problemas, assuntos comunitários, casa e hobbies, cuidados pessoais) bem como dois domínios adicionais: linguagem e comportamento, o que permite mais sensibilidade na detecção de declínio em FTLD. Uma classificação de "0" indica comportamento ou linguagem normal, enquanto pontuações de "1", "2" ou "3" indicam déficits leves a graves. A 'soma das caixas', ou a soma das pontuações dos domínios individuais é usada para determinar a gravidade global da demência. O MMSE é uma avaliação cognitiva global de 11 perguntas amplamente utilizada na prática clínica e de pesquisa. Perguntas tal como "Qual é o ano? Estação? Data? Dia da semana? Mês?" são feitas e um ponto é dado para cada resposta correta, com pontuação máxima fornecida para cada questão. A pontuação máxima total é 30, com dois pontos de corte nas pontuações 24 e 27. Esses pontos de corte são indicadores de declínio cognitivo.

[00108] As avaliações basicamente motoras incluem, por exemplo, Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS). A UPDRS é uma avaliação de 42 itens e 4 partes de vários domínios relacionados ao parquinsonismo, tais como Atividade mental, Comportamento e Humor e Atividades da Vida Diária. Cada item inclui uma escala de classificação tipicamente variando de 0 (tipicamente indicando nenhum prejuízo) a 4 (tipicamente indicando o prejuízo mais

grave). As pontuações de cada parte são computadas para fornecer uma indicação da gravidade da doença com uma pontuação alta de 199 indicando a incapacidade pior/mais total.

[00109] As avaliações basicamente comportamentais incluem, por exemplo, inventário neuropsiquiátrico (NPI) ou inventário comportamental frontal (FBI). O NPI é usado para elucidar a presença de psicopatologia em pacientes com distúrbios cerebrais. Inicialmente, ele foi desenvolvido para uso em populações com doença de Alzheimer; no entanto, pode ser útil avaliar as mudanças comportamentais em outras condições. A avaliação consiste em 10 domínios comportamentais e 2 áreas neurovegetativas, dentro das quais existem 4 pontuações: frequência, gravidade, desgaste do cuidador total. A pontuação total do NPI é obtida somando as pontuações dos domínios comportamentais, menos as pontuações de desgaste do cuidador. O FBI é uma avaliação de 24 itens voltada para avaliar mudanças no comportamento e personalidade associadas especificamente com bvFTD e para diferenciar entre FTD e outras demências. É administrado como uma entrevista face a face com o cuidador principal, pois os pacientes com diagnóstico de bvFTD geralmente não têm critério suficiente sobre esses tipos de mudanças. Ele se concentra em várias áreas relacionadas ao comportamento e à personalidade, pontuando cada pergunta de 0 (nenhuma) a 3 (grave/na maioria das vezes). A pontuação total fornece critérios sobre a gravidade da doença e pode ser usada para avaliar as mudanças ao longo do tempo.

[00110] Outras/Tanto Avaliações Cognitivas quanto Motoras incluem, por exemplo, Escala de Avaliação de Gravidade de Suicídio de Columbia (C-SSRS), Impressão Clínica Global de Mudança (CGI-C), Bateria de Avaliação Frontal (FAB) e/ou Escala de Avaliação de Demência Frontotemporal (FDR). O C-SSRS é uma escala de 3 partes que mede a ideação suicida, a intensidade da ideação e o comporta-

mento suicida por meio de perguntas que avaliam a ideação e o comportamento suicida. O resultado dessa avaliação é composto por uma classificação de letalidade de comportamento suicida tirada diretamente da escala, uma pontuação de ideação suicida e uma classificação de intensidade de ideação suicida. Uma pontuação de ideação maior que 0 pode indicar a necessidade de intervenção, com base nas diretrizes de avaliação. A classificação de intensidade varia de 0 a 25, com 0 representando nenhum endosso de ideação suicida. O CGI-C é uma das três partes de uma avaliação breve e amplamente usada, composta por 3 itens classificados pelo observador clínico. O CGI-C é classificado em uma escala de 7 pontos, variando de 1 (muito melhorado) a 7 (muito pior) a partir da inscrição no estudo, independentemente de qualquer melhoria ser ou não inteiramente devida ao tratamento. O FAB é uma breve avaliação para auxiliar na diferenciação entre demências com fenótipo disexecutivo frontal e do tipo Alzheimer. É particularmente útil em pacientes com demência leve (MMSE > 24). A avaliação consiste em 6 partes, abordando as áreas cognitiva, motora e comportamental, com pontuação total de 18 e pontuações mais altas que indicam melhor desempenho. O FDR é uma avaliação de estadiamento breve para pacientes com demência frontotemporal que detecta diferenças na progressão da doença para subtipos de FTD ao longo do tempo. Esta breve entrevista é conduzida com o cuidador principal e consiste em 30 itens que são categorizados como ocorrendo Nunca, Às vezes ou Sempre. Uma pontuação de porcentagem é então calculada e convertida em uma pontuação logit e, por fim, em uma pontuação de gravidade. A pontuação de gravidade variará de Muito Branda a Profunda.

[00111] Outras medidas de eficácia incluem, o aumento do prazo de sobrevida a partir o ponto do diagnóstico, após o início dos sintomas, é uma medida de eficácia. Atualmente, os pacientes com diagnóstico de

neurodegeneração causada por mutações de *GRN* têm uma expectativa de vida de 7-11 anos a partir do início dos sintomas. Outra medida de eficácia é a estabilização e/ou aumento da atrofia na espessura do córtex frontal médio e nas regiões parietais, que são as regiões cerebrais mais comumente afetadas em todas as apresentações clínicas na população alvo. Isso pode ser avaliado usando MRI ou outras técnicas de imagem. Ainda outras avaliações incluem biomarcadores bioquímicos. Os níveis de proteína PGRN no CSF e no plasma são medidos como uma leitura da transdução de AAV e espera-se que aumentem em pacientes após a administração de rAAV1.hPGRN. Em outras modalidades, os níveis de CSF de cadeia leve de neurofilamento (NFL), tau, tau fosforilada e outros marcadores inflamatórios são avaliados. Em certas modalidades, a modulação e/ou uma diminuição desses níveis de biomarcadores se correlaciona com a eficácia.

[00112] Embora os exemplos abaixo se concentrem no tratamento de certas condições associadas com haploinsuficiências de *GRN* heterozigotas, em certas modalidades, os vetores e composições descritos neste documento podem ser usados no tratamento de outras doenças, por exemplo, doenças associadas com mutação de homozigoto do gene *GRN*, como ceroid neuronal lipofuscinose, câncer (por exemplo, câncer de ovário, mama, adrenal e/ou pancreático), aterosclerose, diabetes tipo 2 e doenças metabólicas.

[00113] Como usado neste documento, o termo Tomografia Computadorizada (CT) refere-se à radiografia na qual uma imagem tridimensional de uma estrutura corporal é construída por computador a partir de uma série de imagens em corte transversal planas feitas ao longo de um eixo.

[00114] O termo "homologia substancial" ou "similaridade substancial", quando refere-se a um ácido nucleico, ou fragmento do mesmo, indica que, quando alinhado de forma otimizada com inserções ou de-

leções de nucleotídeos apropriadas com outro ácido nucleico (ou sua fita complementar), há identidade de sequência de nucleotídeos em pelo menos cerca de 95 a 99% das sequências alinhadas. Preferivelmente, a homologia é sobre a sequência de comprimento total, ou um quadro de leitura aberta da mesma, ou outro fragmento adequado que tem pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento. Exemplos de fragmentos adequados são descritos neste documento.

[00115] Os termos "identidade de sequência", "identidade de sequência percentual" ou "idêntico" no contexto de sequências de ácido nucleico referem-se aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para máxima correspondência. O comprimento de comparação da identidade da sequência pode ser no comprimento total do genoma, no comprimento total de uma sequência de codificação genética ou um fragmento de pelo menos cerca de 500 a 5.000 nucleotídeos. No entanto, a identidade entre fragmentos menores, *por exemplo*, de pelo menos cerca de nove nucleotídeos, normalmente pelo menos cerca de 20 a 24 nucleotídeos, pelo menos cerca de 28 a 32 nucleotídeos, pelo menos cerca de 36 ou mais nucleotídeos, também pode ser desejada. Da mesma forma, a "porcentagem de identidade de sequência" pode ser prontamente determinada para sequências de aminoácidos, ao longo do comprimento total de uma proteína ou um fragmento da mesma. Adequadamente, um fragmento tem pelo menos cerca de 8 aminoácidos de comprimento e pode ter até cerca de 700 aminoácidos. Exemplos de fragmentos adequados são descritos neste documento.

[00116] O termo "homologia substancial" ou "similaridade substancial", quando refere-se a aminoácidos ou fragmentos dos mesmos, indica que, quando alinhado de forma otimizada com inserções ou deleções de aminoácidos apropriadas com outro aminoácido (ou sua fita complementar), há identidade de sequência de aminoácidos em pelo

menos cerca de 95 a 99% das sequências alinhadas. Preferivelmente, a homologia é na sequência de comprimento total, ou uma proteína da mesma, *por exemplo*, uma proteína cap, uma proteína rep ou um fragmento da mesma que tem pelo menos 8 aminoácidos, ou mais desejavelmente, pelo menos 15 aminoácidos de comprimento. Exemplos de fragmentos adequados são descritos neste documento.

[00117] Pelo termo "altamente conservado" entende-se pelo menos 80% de identidade, preferivelmente pelo menos 90% de identidade e, mais preferivelmente, mais de 97% de identidade. A identidade é facilmente determinada por um versado na técnica, recorrendo a algoritmos e programas de computador conhecidos pelos versados na técnica.

[00118] Geralmente, quando se refere a "identidade", "homologia" ou "semelhança" entre dois vírus adeno-associados diferentes, "identidade", "homologia" ou "semelhança" é determinada em referência a sequências "alinhadas". Sequências "alinhadas" ou "alinhamentos" referem-se a múltiplas sequências de ácido nucleico ou proteína (aminoácidos), frequentemente contendo correções para bases ou aminoácidos ausentes ou adicionais em comparação com uma sequência de referência. Nos exemplos, os alinhamentos AAV são realizados usando as sequências AAV9 publicadas como um ponto de referência. Os alinhamentos são realizados usando qualquer uma dentre uma variedade de Programas de Alinhamento de Sequência Múltipla publicamente ou comercialmente disponíveis. Exemplos de tais programas incluem, "Clustal Omega", "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP", e "MEME", que são acessíveis através de Web Servers na Internet. Outras fontes para tais programas são conhecidas pelos versados na técnica. Como alternativa, os utilitários Vector NTI também são usados. Existem também inúmeros algoritmos conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade da sequência de

nucleotídeos, incluindo os contidos nos programas descritos acima. Como outro exemplo, as sequências de polinucleotídeo podem ser comparadas usando o Fasta™, um programa em GCG Versão 6.1. O Fasta™ fornece alinhamentos e a porcentagem de identidade de sequência das regiões com melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa. Por exemplo, a porcentagem de identidade de sequência entre sequências de ácidos nucleicos pode ser determinada usando o Fasta™ com seus parâmetros padrões (tamanho de palavra 6 e fator NOPAM para a matriz de pontuação), como fornecido na versão 6.1 do GCG, incorporada neste documento por referência. Programas de alinhamento de sequência múltipla são disponíveis para sequências de aminoácidos, *por exemplo*, os programas Clustal Omega, Clustal X, MAP, PIMA, MSA, BLOCKMAKER, MEME e Match-Box. Geralmente, qualquer um destes programas é usado em configurações padrão, embora um versado na técnica possa alterar essas configurações como necessário. Alternativamente, um versado na técnica pode utilizar outro algoritmo ou programa de computador que proporciona pelo menos o nível de identidade ou alinhamento como aquele proporcionado pelos algoritmos e programas referenciados. *Ver, por exemplo*, J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

[00119] Deve-se notar que o termo "um" ou "uma" refere-se a um ou mais. Como tal, os termos "um" (ou "uma"), "um ou mais" e "pelo menos um" são usados indistintamente neste documento.

[00120] As palavras "compreendem", "compreende" e "compreendendo" devem ser interpretadas de forma inclusiva em vez de exclusiva. As palavras "consiste", "consistindo" e suas variantes devem ser interpretadas exclusivamente, em vez de inclusivamente. Embora várias modalidades no relatório descritivo sejam apresentadas usando

linguagem "compreensiva", sob outras circunstâncias, uma modalidade relacionada também se destina a ser interpretada e descrita usando a linguagem "consistindo em" ou "consistindo essencialmente em".

[00121] Como usado neste documento, o termo "cerca de" significa uma variabilidade de 10% ($\pm 10\%$, por exemplo, ± 1 , ± 2 , ± 3 , ± 4 , ± 5 , ± 6 , ± 7 , ± 8 , ± 9 , ± 10 , ou valores entre os mesmos) da referência dada, a menos que especificado de outra forma.

[00122] Como usado neste documento, "doença", "distúrbio" e "condição" são usados indistintamente para indicar um estado anormal em um sujeito.

[00123] A menos que definido de outra forma neste pedido, os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como vulgarmente entendido por um versado na técnica e por referência a textos publicados, que proporcionam aos versados na técnica um guia geral para muitos dos termos usados no presente pedido.

[00124] O termo "expressão" é usado neste documento no seu significado mais amplo e compreende a produção de RNA ou de RNA e proteína. Com relação ao RNA, o termo "expressão" ou "tradução" refere-se, em particular, à produção de peptídeos ou proteínas. A expressão pode ser transiente ou estável.

[00125] Como usado neste documento, um "cassete de expressão" refere-se a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de codificação, promotor e pode incluir outras sequências reguladoras para esse fim, cujo cassete pode ser distribuído através de um elemento genético (*por exemplo*, um plasmídeo) para uma célula hospedeira de empacotamento e empacotado no capsídeo de um vetor viral (*por exemplo*, uma partícula viral). Tipicamente, tal cassete de expressão para gerar um vetor viral contém a sequência de codificação para o produto genético descrito neste documento flanqueada por sinais de empacotamento do genoma viral e outras sequências de

controle de expressão, tais como aquelas descritas neste documento.

[00126] Como usado neste documento, o termo "operacionalmente ligado" refere-se a ambas as sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse e sequências de controle de expressão que atuam em trans ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[00127] O termo "heterólogo", quando usado com referência a uma proteína ou um ácido nucleico, indica que a proteína ou o ácido nucleico compreende duas ou mais sequências ou subsequências que não são encontradas na mesma relação entre si na natureza. Por exemplo, o ácido nucleico é tipicamente produzido de forma recombinante, tendo duas ou mais sequências de genes não relacionados dispostos para fazer um novo ácido nucleico funcional. Por exemplo, em uma modalidade, o ácido nucleico tem um promotor de um gene arranjado para dirigir a expressão de uma sequência de codificação de um gene diferente. Assim, com referência à sequência de codificação, o promotor é heterólogo.

[00128] O termo "tradução" no contexto da presente invenção refere-se a um processo no ribossomo, em que uma fita de mRNA controla a montagem de uma sequência de aminoácidos para gerar uma proteína ou um peptídeo.

[00129] Os exemplos seguintes são apenas ilustrativos e não pretendem limitar a presente invenção.

EXEMPLOS

Abreviações	Descrição
A	Absorbância
aa	Aminoácidos
AAV	Vírus Adeno-Associado
AAV1	Sorotipo 1 do Vírus Adeno-Associado
AAV2	Sorotipo 2 do Vírus Adeno-Associado
AAV5	Sorotipo 5 do Vírus Adeno-Associado

Abreviações	Descrição
AAVhu68	Sorotipo hu68 do Vírus Adeno-Associado
ACMG	American College of Medical Genetics
AD	Doença de Alzheimer
AD e FDM	Base de Dados de Mutações Frontotemporal de Doença de Alzheimer e Demência
Ad5	Sorotipo 5 de Adenovírus
AE	Eventos Adversos
AEX	Troca de Ânions
<i>AmpR</i>	Resistência à Ampicilina (gene)
ANOVA	Análise de Variância
ARTFL	Pesquisa Avançada e Tratamento para Degeneração Lobar Frontotemporal
AUC	Ultracentrifugação Analítica
BA	β -Actina
BCA	Ácido Bicinconínico
BDS	Substância de Fármaco a Granel
BMCB	Banco de Células Mestras bacterianas
bp	Pares de Base
BRF	Forma de Registro em Lote
BSA	Albumina de Soro Bovino
BSE	Encefalopatia Espongiforme Bovina
BSC	Gabinete de Segurança Biológica
bvFTD	Demência Frontotemporal Variante Comportamental
BWCB	Banco de Células Bacterianas de Trabalho
<i>C9orf72</i>	Quadro de Leitura Aberta 72 de Cromossomo 9 (gene, humano)
<i>cap</i>	Capsídeo (gene)
CB7	Promotor de β -Actina de Frango e intensificador de CMV
CBC	Hemograma Completo
CBER	Centro para Avaliação e Pesquisa Biológica
CBS	Síndrome Corticobasal

Abreviações	Descrição
CDR-FTLD sb	Soma das Caixas da Escala de Classificação Clínica de Demência (CDR) para Degeneração Lobar Frontotemporal
CFR	Código de Regulamentos Federais
CFU	Unidades Formadoras de Colônias
CGI-C	Impressão Global Clínica de Mudança
CI	Íntron Quimérico
CMC	Fabricação e Controles de Substância Química
CMO	Organização de Fabricação por Contrato
CMV IE	Intensificador Imediato-Precoce de Citomegalovírus
SNC	Sistema Nervoso Central
COA	Certificado de Análise
CPE	Efeitos Citopáticos
CRL	Charles River Laboratories
CRO	Organização de Pesquisa por Contrato
CSF	Líquido Cefalorraquidiano
C-SSRS	Escala de Classificação de Gravidade de Suicídio de Columbia
CT	Tomografia Computadorizada
CTL	Linfócito T Citotóxico
CTSD	Catepsina D
ddPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Digital de Gotícula
DLS	Dispersão de Luz Dinâmica
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMF	Arquivo Mestre de Fármaco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Oxigênio Dissolvido
DP	Produto de Fármaco
DRG	Gânglios da Raiz Dorsal
DS	Substância de Fármaco
<i>E1A</i>	Região 1A Inicial (gene)

Abreviações	Descrição
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido Etilenodiaminatetra-acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima
ELISpot	Immunospot Ligado à Enzima
EU	Unidades de Endotoxina
F	Fêmea
F/U	Acompanhamento
FAB	Bateria de Avaliação Frontal
FBI	Inventário Comportamental Frontal
FBS	Soro Bovino Fetal
FDA	Administração de Alimentos e Fármacos
FDP	Produto de Fármaco Preenchido
FFB	Tampão de Formulação Final
FIH	Primeiro em Ser Humano
FRS	Escala de Avaliação de Demência Frontotemporal
FTD	Demência Frontotemporal
FTLD	Degeneração Lobar Frontotemporal
FTDC	Consórcio Internacional de Critérios FTD de Variante Comportamental
GC	Cópias do Genoma
GENFI	Iniciativa de Demência Frontotemporal Genética
GLP	Boas Práticas de Laboratório
GMP	Boas Práticas de Fabricação
<i>GRN</i>	Precursor de Granulina (gene, humano)
<i>Grn</i>	Precursor de Granulina (gene, camundongo)
GTP	Programa de Terapia Gênica
HCDNA	Ácido Desoxirribonucleico da Célula Hospedeira
HCP	Proteína da Célula Hospedeira
HEK293	Rim Embrionário Humano 293
HEX	Hexosaminidase (proteína)
hPGRN	Progranulina Humana
hPGRN v2	Progranulina Humana versão 2

Abreviações	Descrição
ICH	Conferência Internacional em Harmonização
ICM	Intracisterna Magna
ICP	Pressão Intracraniana
ICV	Intracerebroventricular
IDS	Iduronato-2-Sulfatase
IDUA	Iduronidase
IFN- γ	Gama Interferon
IND	Investigação de Novo Fármaco
IT	Intratecalmente
ITFFB	Tampão de Formulação Final Intratecal
ITR	Repetição de Terminal Invertido
IU	Unidade Infeciosa
IV	Intravenoso
<i>KanR</i>	Resistência à canamicina (gene)
kb	Quilobases
KO	Knockout
LAL	Lisato de Amebócito Limulus
LBD	Demência de Corpo de Lewy
LEFFTDS	Avaliação Longitudinal de Sujeitos com Demência Frontotemporal Familiar
LFTs	Testes de Função Hepática
LLOQ	Limite Inferior de Quantificação
LOD	Limite de Detecção
LP	Punção Lombar
LTFU	Acompanhamento em Longo Prazo
IvPPA	Afasia Progressiva Primária da Variante Logopêni-ca
M	Macho
<i>MAPT</i>	Proteína Tau Associada a Microtúbulos (gene, hu-mano)
MBR	Registro de Lote Mestre
MCB	Banco de Célula Mestre

Abreviações	Descrição
MED	Dose Efetiva Mínima
MMSE	Miniexame de Estado Mental
MRI	Imagem por Ressonância Magnética
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
MS	Espectrometria de Massa
MTD	Dose Máxima Tolerada
N	Número de Sujeitos ou Animais
N/A	Não Aplicável
NAbs	Anticorpos Neutralizantes
NCL	Lipofuscinose Ceroide Neuronal
nfvPPA	Afasia Progressiva Primária Variante Não Fluente
NFL	Cadeia Leve de Neurofilamento
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NHP	Primata Não Humano
NHS	Estudo de Histórico Natural
NPI	Inventário Neuropsiquiátrico
NSAID	Fármaco Anti-inflamatório Não Esteroidal
OL	Rótulo Aberto
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PD	Doença de Parkinson
PEI	Polietilenimina
PES	Polietersulfona
PET	Tomografia por Emissão de Pósitron
PGRN	Progranulina (proteína)
PI	Investigador Principal
POC	Prova de Conceito
PoliA	Poliadenilação
PPA	Afasia Progressiva Primária
PSP	Paralisia Supranuclear Progressiva
QA	Garantia de Qualidade
QC	Controle de Qualidade
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

Abreviações	Descrição
rAAV	Vírus Adeno-associado Recombinante
ROA	Via de Administração
rcAAV	Vírus Adeno-Associado Competente para Replicação
rBG	Coelho β -globina
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
<i>rep</i>	Replicase (gene)
RNA	Ácido Ribonucleico
SA	Braço Único
SAE	Eventos Adversos Sérios
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SOP	Procedimento Operacional Padrão
SRT	Gatilho de Revisão de Segurança
ssDNA	Ácido Desoxirribonucleico de Cadeia Simples
svPPA	Afasia Progressiva Primária Variante Semântica
TBD	A Ser Determinado
TCID ₅₀	50% de Dose Infectiva de Cultura de Tecido
TDP-43	Proteína 43 de Ligação a DNA TAR (proteína)
TE	Tris-EDTA
TFF	Filtração de Fluxo Tangencial
UbC	Ubiquitina C
UCSF	Universidade da Califórnia em São Francisco
UPenn	Universidade da Pensilvânia
UPenn-GTP	Programa de Terapia Genética da Universidade da Pensilvânia
UPDRS	Escala de Classificação Unificada da Doença de Parkinson
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultrade desempenho
US	Estados Unidos
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos
WCB	Banco de Células de Trabalho

Abreviações	Descrição
WT	Tipo Selvagem

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Vetores

[00130] Um cDNA de PGRN humano modificado foi clonado em um construto de expressão contendo um promotor de beta-actina de galinha com intensificador precoce de citomegalovírus, um íntron quimérico e uma sequência de poliadenilação de beta-globina de coelho (FIG. 1). Um segundo cDNA de PGRN humano modificado foi clonado em um construto de expressão contendo o promotor C de ubiquitina humana. Os construtos de expressão foram flanqueados por repetições terminais invertidas de AAV2. Os sorotipos de vírus adeno-associados 1, 5 e 68 humano (AAVhu68) foram gerados a partir deste construto por transfecção tripla de células HEK293 e purificação de iodixanol como descrito anteriormente (Lock M, et al. Hum Gene Ther. 2010;21(10):1259-71).

Procedimentos em Animal

[00131] Todos os protocolos de animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Pensilvânia. Pares reprodutores de camundongos knockout GRN foram adquiridos do laboratório Jackson (estoque # 013175), e uma colônia foi mantida na Universidade da Pensilvânia. C57BL/6 de tipo selvagem (estoque # 000664) serviu como controle. No primeiro estudo, camundongos com 2 meses de idade foram anestesiados com isoflurano e injetados no ventrículo cerebral lateral (ICV) com 1×10^{11} cópias do genoma do vetor (GC) em um volume de 5 μ L. 60 dias após a injeção, os camundongos foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia com cetamina/xilazina e a morte foi confirmada por deslocamento cervical. No segundo estudo, os camundongos foram tratados aos 7 meses de idade e sacrificados aos 11 meses de idade. No momento da necrópsia, o soro foi coletado por punção cardíaca e o CSF foi cole-

tado por punção sub-occipital com uma agulha de calibre 32 conectada a um tubo de polietileno. Amostras de soro e CSF foram imediatamente congeladas em gelo seco e armazenadas a -80 graus até a análise. O córtex frontal foi coletado para bioquímica e imediatamente congelado em gelo seco, enquanto o resto do cérebro foi fixado em formalina a 10% para histologia.

[00132] Macacos rhesus de 3-4 anos foram comprados da Covance. Para a administração do vetor, os animais foram sedados com dexmedetomidina e cetamina intramuscular e administrados com uma única injeção intracisterna magna (ICM) de 3×10^{13} GC de um vetor AAV em 1 mL de CSF artificial. A colocação da agulha foi verificada por meio de mielografia usando um fluoroscópio (OEC9800 C-Arm, GE), como descrito anteriormente (Katz N, et al. Hum Gene Ther Methods. 2018 Oct;29(5):212-219). Os animais foram sacrificados por overdose de barbitúricos. Os tecidos coletados foram imediatamente congelados em gelo seco ou fixados em formalina a 10% para histologia.

Histologia e imagem

[00133] Cérebros de camundongos foram fixados em formalina a 10%, crio-preservados em sacarose, incluídos em composto de temperatura de corte ideal (OCT) e seccionado em criostato. Imagens de baixa ampliação de material autofluorescente (lipofuscina) de regiões de interesse foram obtidas. Os depósitos de lipofuscina foram quantificados de forma cega, usando o software Image J. Tecidos de primatas não humanos foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e manchados com Hematoxilina e Eosina (H&E). As lâminas foram revisadas por um patologista veterinário certificado pelo conselho (ELB). Para os animais tratados com vetores GFP, as seções do cérebro foram manchadas com anticorpos contra olig2, GFAP ou NeuN. Todas as seções foram comanchadas com DAPI e um anticorpo contra

GFP, seguido por anticorpos secundários fluorescentes. As lâminas foram digitalizadas em um scanner de slides Leica Aperio Versa 200 e baixadas do eSlide Manager para serem analisadas no software de imagem HALO (Indica Labs). Cinco regiões do hemisfério direito foram amostradas para cada animal, e as células com cada marcador de tipo de célula foram quantificadas. As células foram detectadas ajustando as seguintes configurações: "intensidade nuclear mínima", "tamanho nuclear", "agressividade de segmentação nuclear" e "circularidade nuclear mínima", no tab. de detecção de núcleos. Em seguida, os critérios foram definidos para cada corante individual para identificar ainda mais as células e gerar uma contagem de células total quantitativa para cada marcador. As configurações foram determinadas empiricamente com base na sensibilidade e confiabilidade da detecção do tipo de célula desejado; em alguns casos, configurações como a detecção de NeuN no citoplasma não refletiram a verdadeira localização intracelular do marcador, mas forneceram maior especificidade e sensibilidade de detecção. Todas as células detectadas por meios automatizados foram verificadas manualmente. Para os neurônios, na guia "corante 1", o "limiar positivo do núcleo" e o "limiar positivo do citoplasma" foram ajustados para detectar apenas células com NeuN presentes tanto no núcleo quanto no citoplasma. Para os astrócitos, foram selecionados marcadores DAPI e GFAP e ambos deveriam estar presentes no núcleo e no citoplasma de uma célula para serem incluídos na contagem. Para os oligodendrócitos, uma célula foi contada se DAPI e olig2 estivessem ambos presentes no núcleo, mas não no citoplasma da célula. Para a colocalização, as mesmas configurações foram usadas, no entanto GFP foi incluído como um corante adicional no núcleo para neurônios e tanto no núcleo quanto no citoplasma para astrócitos. As células que não expressaram todos os marcadores selecionados foram eliminadas da tabela de resultados gerados, "mascarando-as"

usando a função de "máscara" do núcleo ou citoplasma. Por causa da escassez de células positivas para GFP colocadas com olig2, os oligodendrócitos transduzidos foram contados manualmente. Em alguns casos, os vasos sanguíneos ou porções do plexo coroide exibiram autofluorescência e foram esboçados manualmente e excluídos usando a ferramenta "tesoura". Os valores resultantes foram expressos como porcentagens de células positivas para GFP para cada marcador de tipo de célula.

Preparação de amostra para ensaio de hexosaminidase (Hex)

[00134] O soro foi usado diretamente no ensaio de atividade Hex, enquanto as amostras de cérebro foram homogeneizadas em tampão de lise (0,2% Triton-X100, 0,9% NaCl, pH 4,0), seguido de três ciclos de congelamento-descongelamento e clarificação por centrifugação. As concentrações de proteína foram determinadas pelo ensaio de Bradford. As medições da atividade Hex foram realizadas como descrito anteriormente (Hinderer C, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2014;22(12):2018-27).

ELISA

[00135] O PGRN humano foi medido usando um kit DuoSet ELISA (R&D # DY2420) com pequenas modificações. Resumidamente, placas de ELISA de poliestireno de alta ligação foram revestidas durante a noite a 4°C com 5ug/ml de anticorpo de captura de PGRN humano diluído em salina tamponada com fosfato (PBS). Após a lavagem, as placas foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) a 1% em PBS por 2 horas, seguido de incubação da amostra por uma hora. O CSF humano e de primata não humano foi diluído 1:5, enquanto as amostras de CSF de murino foram diluídas 1:40 em PBS. As amostras de cérebro foram diluídas a uma concentração de proteína total de 2 mg/ml em tampão de lise. O anticorpo ligado foi detectado com anticorpo de Progranulina Camundongo anti-humano biotinilado e estrepto-

tavidina-HRP. As placas foram desenvolvidas usando substrato de tetrametilbenzidina por 20 minutos, em seguida, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2 N, antes da medição da absorbância a 450 nm.

Ensaio de anticorpo neutralizante

[00136] Os anticorpos neutralizantes contra AAVhu68 foram avaliados como descrito anteriormente (Calcedo R, et al. J Infect Dis. 2009;199(3):381-90).

Estatísticas

[00137] As comparações da atividade enzimática Hex, contagens de lipofuscina e área de CD68 + em camundongos knockout GRN e GRN tratados com AAV foram realizadas usando ANOVA a uma via seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey post-hoc.

Exemplo 2: distribuição mediada por AAV de um transgene GRN humano em um modelo de doença de murino

[00138] Vetores de AAV recombinantes com capsídeos de AAVhu68 que expressam PGRN humano (SEQ ID NO: 3) sob o controle de um promotor CB7 e íntron quimérico (CB7.Cl.hPGRN.rBG) foram produzidos usando técnicas de transfecção tripla publicadas como descrito, por exemplo, WO 2018/160582.

[00139] Avaliou-se a distribuição mediada por AAV de um transgene GRN humano em um modelo de camundongo knockout GRN. Camundongos heterozigotos para mutações de GRN (GRN^{+/-}) não exibem marcas patológicas de doença neurodegenerativa relacionada a GRN, provavelmente porque a vida útil do camundongo não permite o desenvolvimento das sequelas de haploinsuficiência de GRN, que se manifestam pela primeira vez após várias décadas em humanos. Ao contrário, a deficiência completa de PGRN em camundongos GRN^{-/-} recapitula várias características precoces da haploinsuficiência de GRN em humanos, tais como função lisossomal prejudicada, acúmulo

de material de armazenamento lisossomal autofluorescente (lipofusцина) e ativação da microglia, embora camundongos GRN^{-/-} não exibam perda de neurônios mesmo até os dois anos de idade (Lui H, et al. Cell. 2016;165(4):921-35; Ward ME, et al. Sci Transl Med. 2017 Apr 12;9(385):pii: eaah5642). Tanto camundongos GRN^{+/-} quanto GRN^{-/-} foram relatados para exibir anormalidades de comportamento, mas os resultados foram inconsistentes entre os grupos (Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010;177(1):311-24; Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012;228(1):67-76; Ghoshal N, et al. Neurobiology of Disease. 2012;45(1):395-408; Filiano AJ, et al. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. 2013;33(12):5352-61; Yin F, et al. The FASEB Journal. 2010;24(12):4639-47). Da mesma forma, alguns relatórios indicaram sobrevida reduzida em camundongos GRN^{-/-}, enquanto outros descobriram que os camundongos GRN^{-/-} têm uma expectativa de vida normal, consistente com nossa experiência (Ahmed Z, et al. Am J Pathol. 2010;177(1):311-24; Wils H, et al. The Journal of Pathology. 2012;228(1):67-76). Embora os camundongos GRN^{-/-} não exibam neurodegeneração evidente ou sinais neurológicos, as notáveis semelhanças bioquímicas e histológicas com a haploinsuficiência de GRN em humanos os tornam um modelo potencialmente informativo para avaliar novas terapias. Portanto, focamos nossas análises nesses achados bioquímicos e histológicos em camundongos GRN^{-/-}.

[00140] O objetivo deste estudo foi avaliar se a distribuição do gene GRN humano ao cérebro pode eliminar o material de armazenamento lisossomal existente e normalizar a função do lisossoma em camundongos GRN^{-/-}. Em resposta ao armazenamento lisossomal, as células regulam positivamente a expressão de enzimas lisossomais, que podem ser usadas como biomarcadores para doenças de armazenamento lisossomal (Hinderer C, et al. Molecular therapy : the journal of the

American Society of Gene Therapy. 2014;22(12):2018-27; Gurda BL, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(2):206-16; Karageorgos LE, et al. Experimental Cell Research. 1997;234(1):85-97). Avaliamos a atividade da enzima lisossomal hexosaminidase no tecido cerebral de camundongos GRN^{-/-} e GRN^{+/+} de diferentes idades, bem como depósitos de lipofusцина no córtex, hipocampo e tálamo (FIG. 3A - FIG. 3D). A atividade elevada da hexosaminidase foi evidente ao longo da vida, enquanto a lipofusцина exibiu acúmulo progressivo. A lipofusцина foi aparente aos 2 meses de idade, consistente com achados anteriores (Klein ZA, et al. Neuron. 2017;95(2):281-96 e6). Nossos estudos iniciais foram realizados com um vetor de AAV baseado no AAVhu68 isolado natural, que está intimamente relacionado ao clade F de AAV9 isolado. Tratamos camundongos GRN^{-/-} aos 2-3 meses de idade com uma injeção intracerebroventricular (ICV) de um vetor AAVhu68 expressando GRN humano ou veículo (PBS) (N = 10 por grupo). Além disso, uma coorte de camundongos de tipo selvagem foi injetada com veículo (N = 10). O ICV ROA (envolvendo a injeção do vetor de AAV diretamente no CSF dos ventrículos cerebrais) foi usado porque o pequeno tamanho do camundongo de 2 meses torna difícil administrar o vetor de forma confiável através da via ICM, que é o ROA que é usado para o estudo NHP e o ensaio clínico FIH proposto. Estudos anteriores demonstraram que a administração ICV de AAVhu68 na dose selecionada para este estudo (10¹¹ GC) resulta em transdução limitada às regiões do cérebro próximas ao ventrículo injetado, tornando este um sistema útil para avaliar se melhorias globais nas lesões cerebrais podem ser alcançadas através da secreção de PGRN por uma pequena população de células.

[00141] Dois meses após a administração do vetor, os animais foram sacrificados e o cérebro, o CSF e o soro foram coletados. A quan-

tificação dos níveis de proteína PGRN humana no cérebro confirmou a transdução no grupo tratado com AAV (FIG. 4A - FIG. 4F). PGRN é uma proteína secretada que pode ser medida no CSF e é reduzida no CSF de portadores da mutação GRN humana (Lui H, et al. Cell. 2016;165(4):921-35; Meeter LH, et al. Dement Geriatr Cogn Dis Extra. 2016;6(2):330-40). Portanto, avaliamos os níveis de proteína PGRN no CSF de camundongos GRN^{-/-} tratados com AAV, que revelou uma concentração média de CSF de 14 ng/mL, enquanto nos grupos tratados com veículo, o PGRN humano estava abaixo dos níveis de detecção (FIG. 4A - FIG. 4F). A expressão de PGRN foi acompanhada pela normalização da expressão da enzima lisossomal, com os níveis de atividade Hex retornando aos níveis quase normais nos cérebros de camundongos GRN^{-/-} tratados com AAV (FIG. 4A - FIG. 4F).

[00142] Depois de confirmar a expressão de PGRN nos cérebros de camundongos GRN^{-/-}, avaliamos se a expressão de PGRN reduziu o número de depósitos de lipofuscina no hipocampo, tálamo e córtex. Para esse propósito, secções fixas do cérebro não manchadas foram montadas em lamínula e lipofuscina autofluorescente foi fotografada e quantificada de forma cega. Camundongos GRN^{-/-} tratados com AAV exibiram lipofuscina reduzida em todas as regiões do cérebro em comparação com camundongos GRN^{-/-} tratados com veículo e níveis semelhantes aos controles de tipo selvagem de mesma idade (FIG. 4A - FIG. 4F).

[00143] A prova inicial do estudo de conceito demonstrou a atividade terapêutica da expressão de PGRN mediada por AAV em camundongos tratados em idade precoce, quando o material de armazenamento apenas começou a aparecer no cérebro. Subsequentemente, avaliamos o impacto da transferência de genes em camundongos mais velhos com patologia pré-existente mais grave. Neste estudo, camundongos GRN^{-/-} de 7 meses de idade receberam uma única injeção ICV

de um vetor AAVhu68 que expressa PGRN humano ou veículo e foram sacrificados aos 11 meses de idade. Além de depósitos extensivos de lipofuscina no cérebro (FIG. 5A - FIG. 5D), camundongos GRN^{-/-} de 11 meses de idade exibiram microgliose extensiva, semelhante a pacientes com FTD causada por mutações de GRN (FIG. 6A - FIG. 6C) (Ahmed Z, et al. Journal of neuroinflammation. J Neuroinflammation. 2007 Feb 11;4:7). A transferência do gene GRN reduziu a atividade Hex cerebral e os depósitos de lipofuscina em camundongos idosos de forma semelhante às descobertas em animais mais jovens (FIG. 5A - FIG. 5D). Além disso, o tamanho e o número de microglia foram normalizados nos cérebros de camundongos tratados (FIG. 6A - FIG. 6C).

[00144] Cumulativamente, a distribuição ICV de um vetor de AAV que expressa PGRN humano ao cérebro de camundongos GRN^{-/-} eliminou agregados de lipofuscina e quase totalmente normalizou a atividade enzimática lisossomal, demonstrando que a administração do gene PGRN pode corrigir efetivamente aspectos-chave da fisiopatologia subjacente de doenças neurodegenerativas relacionadas a GRN .

Exemplo 3: Transferência gene GRN mediada por AAV em primatas não humanos

[00145] As descobertas em camundongos GRN^{-/-} demonstram que a administração de um vetor de AAV no CSF pode atingir transdução cerebral suficiente para produzir níveis terapêuticos de PGRN e prevenir ou reverter os achados bioquímicos e histológicos associados à deficiência de PGRN. A fim de traduzir essa abordagem para humanos, estudos foram realizados em primatas não humanos usando administração ICM, uma via clinicamente relevante de administração de vetor. A administração intratecal de AAV poro meio de injeção na cisterna magna é uma abordagem minimamente invasiva que resulta em uma transdução cerebral mais extensiva do que a administração por punção lombar (Hinderer C, et al. Molecular therapy Methods & clinical

development. 2014; 1: 14051). Os NHPs de 3 a 10 anos de idade foram utilizados porque essa idade é representativa da população pretendida de pacientes adultos. Macacos Rhesus (N = 2 por grupo) foram administrados com uma única injeção de ICM guiada por imagem de um vetor AAV1, AAV5 ou AAVhu68 expressando *GRN* humano de um transgene denominado hPGRN (SEQ ID NO: 3) sob o controle de um promotor BA de frango e intensificador de CMV IE (referido como o promotor CB7). Um grupo adicional foi tratado com um vetor AAVhu68 carregando uma sequência de transgene diferente (hPGRN v2, SEQ ID NO: 4) expressa a partir de um promotor de ubiquitina C (UbC). Os níveis de progranulina humana no CSF foram medidos semanalmente e os animais foram sacrificados 35 dias após a injeção para análise histopatológica. Análises de segurança preliminares foram realizadas, incluindo observações diárias do lado da gaiola, exames físicos em série, hemogramas completos, painéis de substância química do soro, substância química de CSF e citologia e uma necrópsia completa com avaliação microscópica do cérebro e da medula espinhal. Os grupos de tratamento estão sumarizados na tabela abaixo.

Capsídeo	Transgene	Promo- tor	Espécies	N	ROA	Dose	Volume de Injeção
AAVhu68	hPGRN	CB7	Macaco rhesus adulto	2	ICM	3,00 x 10 ¹³ GC	1 mL
AAVhu68	hPGRN v2	UbC		2			
AAV1	hPGRN	CB7		2			
AAV5	hPGRN	CB7		2			

[00146] A expressão robusta de PGRN foi detectada no CSF de todos os NHPs após a administração do vetor (FIG. 7A). Os dois animais tratados com o vetor AAVhu68 exibiram níveis de PGRN humano de CSF até 10 vezes maiores do que aqueles de controles humanos saudáveis e semelhantes aos níveis que revertem anormalidades lisossomais nos cérebros de camundongos *GRN*^{-/-}. O tratamento com AAV5 rendeu níveis de expressão de CSF aproximadamente equiva-

lentes aos de AAVhu68. A expressão de PGRN humano foi maior nos animais tratados com um vetor AAV1, atingindo níveis humanos normais mais de 40 vezes. As amostras de CSF e plasma dos NHPs tratados com os vetores AAVhu68 e AAV1 foram testados quanto aos anticorpos para PGRN humano. Todos os quatro animais desenvolveram anticorpos para o produto transgene humano (FIG. 8A - FIG. 8C), o que pode explicar os níveis de expressão em declínio no final do estudo. O início da resposta do anticorpo PGRN anti-humano no CSF se correlacionou com os níveis de expressão do transgene, com pico mais cedo no grupo AAV1.

[00147] A administração de ICM AAV foi bem tolerada em todos os grupos de tratamento. Nenhuma anormalidade relacionada ao tratamento foi identificada em observações diárias, exames físicos, hemogramas completos ou painéis de substância química sérica. Semelhante a outros estudos de ICM AAV utilizando um transgene xenogênico (Hordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10(79-88), a análise de CSF revelou uma pleocitose linfocítica assintomática começando 7–21 dias após a injeção para todos os sorotipos de vetor, espelhando a resposta do anticorpo ao produto do transgene (FIG. 8A - FIG. 8C). As contagens de células no CSF diminuíram dos níveis máximos, mas permaneceram elevadas no momento da necrópsia para a maioria dos animais. A histopatologia do cérebro e da medula espinhal foi avaliada para os grupos tratados com AAV1 e AAVhu68. As verificações foram semelhantes aos estudos ICM AAV anteriores (Hordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:79-88; Hordeaux J, et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:68-78), com infiltrados linfocíticos mínimos ocasionais identificados nas meninges e plexo coroide, e degeneração dos neurônios sensoriais e seus axônios associados em alguns gânglios da raiz dorsal (DRG) e seções da medula espinhal. Como em estudos anteriores do ICM AAV, as verificações dos neurô-

nios sensoriais foram tipicamente de gravidade mínima a leve e não associados a sinais clínicos (Gurda BL, et al. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2016;24(2):206-16; Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10:79-88; Hordeaux J, et al. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018;10:68-78). Não notamos nenhuma anormalidade relacionada ao vetor no parênquima cerebral de qualquer animal.

Diferentes padrões de transdução do SNC após a administração de ICM dos vetores AAV1 e AAVhu68 a primatas não humanos

[00148] A expressão de PGRN notadamente mais elevada no CSF de NHPs tratados com um vetor de AAV1 nos levou a explorar ainda mais as diferenças nos padrões de transdução dos vetores de AAV1, AAV5 e AAVhu68. NHPs foram administrados com uma única injeção de ICM de um vetor de AAV1, AAV5 ou AAVhu68 (3×10^{13} GC, $n = 2$ por vetor) expressando um gene repórter GFP. Os animais foram sacrificados 28 dias após a injeção para análise histológica da transdução cerebral.

[00149] A imuno-histoquímica revelou transdução difusa e irregular ao longo dos cérebros de NHPs tratados com os vetores de AAV1 e AAVhu68 (não mostrado). A transdução mínima foi evidente no cérebro de animais que receberam o vetor de AAV5. A fim de caracterizar mais precisamente as diferenças na transdução entre AAV1 e AAVhu68, um método semiautomático foi desenvolvido para quantificar células transduzidas em seções coletadas de várias regiões do cérebro. Usando seções manchadas com anticorpos marcados com fluorescência contra GFP e marcadores de tipos de células específicos, o número total de neurônios, oligodendrócitos e astrócitos foram quantificados por manchamento NeuN, olig2 e GFAP, respectivamente, seguido pela quantificação de células que expressam GFP de cada tipo (FIG 9, FIG. 10). Cada qual de AAV1 e AAVhu68 transduziu menos de

um por cento de cada tipo de célula em todas as regiões examinadas. A transdução de neurônios foi quase equivalente entre os dois vetores, enquanto AAVhu68 pareceu transduzir um número modestamente maior de astrócitos e oligodendrócitos.

[00150] A transdução cerebral aproximadamente equivalente observada com os vetores de AAV1 e AAVhu68 foi inesperada, dados os níveis de CSF PGRN drasticamente mais elevados alcançados com AAV1. A transdução de células ependimais foi avaliada por imunohistoquímica em várias regiões do ventrículo lateral e quarto ventrículo de animais tratados com AAVhu68 e animal RA1826 tratado com AAV1. Interessantemente, múltiplas seções do cérebro de um animal tratado com AAV1 (RA1826) que continham porções do sistema ventricular demonstraram extensa transdução das células ependimais que revestem os ventrículos, o que não foi observado em nenhum dos animais tratados com AAVhu68 (não mostrado). Uma média de 48% das células ependimais foram transduzidas em todas as regiões amostradas, incluindo o corno frontal, temporal e occipital do ventrículo lateral e o quarto ventrículo. Ao contrário, apenas 1-2% das células ependimárias foram transduzidas nas mesmas regiões do cérebro dos animais que receberam o vetor AAVhu68. Apenas pequenos segmentos de um ventrículo lateral foram avaliados no segundo animal tratado com AAV1, que mostrou aproximadamente 1% de transdução de células ependimais, embora a análise tenha se limitado à pequena região amostrada. Essas verificações sugerem que células ependimais altamente transduzidas em animais tratados com AAV1 podem ser a fonte de altos níveis de PGRN no CSF, uma vez que a transdução de outros tipos de células parecia semelhante entre os dois sorotipos. O efeito espectador mediado por PGRN secretado torna FTD causado por mutações de GRN excepcionalmente passível de terapia genética AAV. Uma vez que o PGRN extracelular pode ser absorvido pelos neurô-

nios, os altos níveis de PGRN no CSF alcançados com o vetor AAV1 - aparentemente mediado pela transdução robusta de células ependimal - torna o AAV1 uma escolha ideal para terapia do gene GRN.

Exemplo 4: AAV1.PGRN recombinante

[00151] rAAV1.O PGRN é produzido por transfecção de plasmídeo triplo de células HEK293 com: 1) o plasmídeo AAV *cis* (denominado pENN.AAV.CB7.Cl.hPGRN.rBG.KanR) que codifica a cassete do transgene flanqueada por AAV ITRs, 2) o plasmídeo AAV *trans* (denominado pAAV2/1.KanR) que codifica os genes AAV2 *rep* e AAV1 *cap*, e 3) o plasmídeo de adenovírus auxiliar (denominado pAdΔF6.KanR). O tamanho do rAAV1.O genoma do vetor empacotado PGRN tem 4129 bases.

A. Elementos de Sequência de Plasmídeo do Genoma do Vetor de AAV

[00152] Um mapa linear do genoma do vetor do plasmídeo *cis*, denominado pENN.AAV.CB7.Cl.hPGRN.rBG.KanR (p4862). Ver FIG. 2.

[00153] O plasmídeo *cis* contém os seguintes elementos da sequência do genoma do vetor:

[00154] 1. Inverted Terminal Repeat (ITR): The ITRs são sequências complementares reversas idênticas derivadas de AAV2 (130 pares de bases [bp], GenBank: NC_001401) que flanqueiam todos os componentes do genoma do vetor. As ITRs funcionam como a origem da replicação do DNA do vetor e o sinal de empacotamento para o genoma do vetor quando as funções auxiliares de AAV e adenovírus são fornecidas em *trans*. Como tal, as sequências ITR representam as únicas sequência de atuação *cis* necessárias para a replicação e empacotamento do genoma do vetor.

[00155] 2. Intensificador Imediato-Precoce de Citomegalovírus Humano (CMV IE): Esta sequência intensificadora obtida de CMV derivado de humanos (382 pb, GenBank: K03104.1) aumenta a expressão

de transgenes a jusante.

[00156] 3. Promotor de β -Actina de Galinha (BA): Este promotor ubíquo (282 pb, GenBank: X00182.1) foi selecionado para conduzir a expressão do transgene em qualquer tipo de célula do SNC.

[00157] 4. Íntron quimérico (CI): O íntron híbrido consiste em um doador de splice de β -actina de galinha (973 bp, GenBank: X00182.1) e um elemento aceptor de splice de β -globina de coelho. O íntron é transcrito, mas removido do mRNA maduro por splicing, reunindo as sequências de cada lado dele. Foi demonstrado que a presença de um íntron em um cassete de expressão facilita o transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma, aumentando assim o acúmulo do nível estável de mRNA para tradução. Esta é uma característica comum em vetores genéticos destinados a níveis aumentados de expressão genética.

[00158] 5. Sequência de codificação: O cDNA modificado do gene *GRN* humano codifica a proteína PGRN humana (hPGRN), que está implicada na função lisossomal e outras funções do sistema nervoso (1785 bp, GenBank: NM_002087.3; 593 aminoácidos [aa], GenBank: NP_002078).

[00159] 6. Sinal de Poliadenilação de β -globina de Coelho (rBG PolyA): O sinal rBG PolyA (127 bp, GenBank: V00882.1) facilita a poliadenilação eficiente do mRNA do transgene em *cis*. Este elemento funciona como um sinal para a terminação transcricional, um evento de clivagem específica na extremidade 3' do transcrito nascente e a adição de uma longa cauda de poliadenil.

B. Plasmídeo trans AAV1: pAAV2/1.KanR (p0069)

[00160] O plasmídeo *trans* AAV2/1 é pAAV2/1.KanR (p0069). O pAAV2/1.O plasmídeo KanR tem 8113 pb de comprimento e codifica quatro proteínas replicase (Rep) de AAV2 de tipo selvagem necessárias para a replicação e empacotamento do genoma do vetor AAV.

pAAV2/1.KanR também codifica três proteínas do capsídeo da proteína do vírion AAV1 (Cap) de tipo selvagem, que se montam em uma casca do vírion do sorotipo AAV 1 (AAV1) para abrigar o genoma do vetor AAV. Os genes *cap* AAV1 contidos em pAAV2/1.KanR foram isolados de uma fonte sítia.

[00161] Para criar o pAAV2/1.Construto KanR, um fragmento de 3,0 quilobases (kb) de p5E18 (2/2), um fragmento de 2,3 kb de pAV1H e um fragmento de 1,7 kb de p5E18 (2/2) foram incorporados para formar pAAV2/1 (p0001), que contém *rep* AAV2 e *cap* AAV1 em um cassette de resistência a ampicilina (*AmpR*) (referido na literatura como p5E18 [2/1]). Esta estratégia de clonagem também realocou a sequência do promotor *p5* de AAV (que normalmente conduz a expressão de *rep*) da extremidade 5' de *reppara* a extremidade 3' de *cap*, deixando para trás um promotor *p5* truncado à montante de *rep*. Este promotor truncado serve para regular negativamente a expressão de *rep* e, consequentemente, maximizar a produção do vetor (Xiao et al., (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol. 73(5):3994-4003).

[00162] Para gerar pAAV2/1.KanR para a fabricação de produtos clínicos, o gene de resistência a ampicilina (*AmpR*) na sequência principal de pAAV2/1 foi substituído pelo gene de resistência a canamicina (*KanR*). Todas as partes componentes dos plasmídeos *trans* foram verificadas por sequenciamento direto.

C. Plasmídeo Auxiliar de Adenovírus: pAdDeltaF6 (KanR)

[00163] O plasmídeo pAdDeltaF6 (KanR) foi construído no laboratório do Dr. James M. Wilson e colegas na Universidade da Pensilvânia e tem um tamanho de 15.774 pb. O plasmídeo contém as regiões do genoma do adenovírus que são importantes para a replicação de AAV; a saber, *E2A*, *E4* e *VA* RNA (as funções E1 do adenovírus são fornecidas pelas células HEK293). No entanto, o plasmídeo não contém ou-

tra replicação de adenovírus ou genes estruturais. O plasmídeo não contém os elementos *cis* críticos para replicação, tais como as ITRs adenovirais, portanto, não se espera geração de adenovírus infecciosos. O plasmídeo foi derivado de um clone molecular com E1, E3 de Ad5 deletado (pBHG10, um plasmídeo baseado em pBR322). Deleções foram introduzidas no Ad5 para eliminar a expressão de genes de adenovírus desnecessários e reduzir a quantidade de DNA de adenovírus de 32 kb para 12 kb). Finalmente, o gene de resistência a ampicilina foi substituído pelo gene de resistência a canamicina para criar pAdeltaF6(KanR). Os genes adenovirais *E2*, *E4* e *VA1* que permanecem neste plasmídeo, juntamente com *E1*, que está presente nas células HEK293, são necessários para a produção do vetor de AAV. O vetor é produzido de acordo com os seguintes fluxogramas mostrados na FIG. 13 e FIG. 14.

[00164] O produto final deve ter um pH na faixa de 6,2 a 7,7, como determinado pela USP <791>, e um teor de osmolaridade de 260 a 320 mOsm/kg como determinado pela USP <785>, e um GCtiter maior ou igual a $2,5 \times 10^{13}$ GC/mL como determinado por ddPCR (Lock et al, (2014). "Determinação absoluta dos tituladores do genoma do vetor viral adeno-associado e autocomplementar de fita simples por PCR digital de gotícula". Hum Gene Ther Methods. 25 (2): 115-25.

EXEMPLO 5: Identificação da Dose Mínima Eficaz de rAAV1.PGRN no Modelo Camundongo GRN^{-/-}

• Dose • (GC/g de massa cerebral)	• Camundongo (GC)	• NHP (GC)	• Ser Humano (GC)
$3,33 \times 10^{11}$	$1,30 \times 10^{11}$	$3,00 \times 10^{13}$	$4,33 \times 10^{14}$
$1,11 \times 10^{11}$	$4,40 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{13}$	$1,44 \times 10^{14}$
$3,33 \times 10^{10}$	$1,30 \times 10^{10}$	$3,00 \times 10^{12}$	$4,33 \times 10^{13}$
$1,11 \times 10^{10}$	$4,40 \times 10^9$	-	$1,44 \times 10^{13}$

[00165] O impacto de diferentes doses de rAAV1.PGRN em lesões

do SNC no modelo de camundongo *Grn*^{-/-} é avaliado como a seguir. A eficácia é avaliada pela extensão da redução na patologia de armazenamento cerebral (lipofuscina), que serve como uma medida de resultado quantitativa que está diretamente ligada à fisiopatologia da doença. Além disso, a coleta de sangue terminal para hemogramas completos e painéis de substância química de soro, bem como histopatologia de órgãos alvos, são incluídos para identificar a toxicidade específica da doença que pode não ser detectada no estudo de toxicologia do NHP. Os camundongos são tratados aos 5–6 meses de idade, quando o armazenamento extensivo de lipofuscina está presente para replicar o estado da doença em sujeitos idosos com haploinsuficiência de *GRN*. Os camundongos *Grn*^{-/-} recebem uma das quatro doses de rAAV1.PGRN (1,30 x 10¹¹ GC, 4,40 x 10¹⁰ GC, 1,30 x 10¹⁰ GC, ou 4,40 x 10⁹ GC) ou veículo (ITFFB [CSF artificial com 0,001% de Pluronic F-68]) por injeção de ICV (N = 15 por grupo). Camundongos *Grn*^{+/+} tratados com veículo (N = 15) servem como controles normais. Os animais são sacrificados 90 dias após o tratamento, os cérebros são colhidos e seccionados e as lesões de lipofuscina são quantificadas. A MED é determinada pela dose que mostra redução significativa nas lesões de armazenamento cerebral em relação aos camundongos *Grn*^{-/-} tratados com veículo e a significância é determinada usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (alfa = 0,05), se aplicável.

EXEMPLO 6: Estudo de Toxicologia em Primatas Não Humanos

[00166] rAAV1.CB7.Cl.hPGRN.rBG, é um vetor adeno-associado (AAV) recombinante não replicante que consiste no sorotipo AAV1, que contém um cDNA de progranulina humana (PGRN) modificado sob o controle de um promotor de beta actina de galinha com intensificador de citomegalovírus e uma sequência de poliadenilação de beta globina de coelho flanqueada por repetições terminais invertidas de

sorotipo 2 de AAV formuladas em tampão de formulação final intratecal (ITFFB). O titulador ddPCR foi de $2,04 \times 10^{13}$ GC/mL. O pH do ITFFB foi ajustado a pH 7,4 para maximizar a solubilidade do produto do artigo de teste. O(s) artigo(s) de controle foram preparados no dia da dosagem. Os artigos diluídos são mantidos em gelo úmido ou a $2-8^{\circ}\text{C}$ até a dosagem no mesmo dia.

[00167] Um estudo de segurança compatível com GLP de 90 dias em macacos rhesus adultos para investigar a toxicologia de rAAV1.PGRN após a administração de ICM foi realizado. Os NHPs de 3 a 10 anos de idade foram utilizados para esse estudo porque essa idade é representativa da nossa população pretendida de pacientes humanos adultos. O período de avaliação de 90 dias foi selecionado porque isso permite tempo suficiente para um produto transgene secretado atingir níveis de platô estáveis após a administração de ICM AAV. Os macacos Rhesus receberam um dos três níveis de dose - $3,00 \times 10^{12}$ GC total, $1,00 \times 10^{13}$ GC total ou $3,00 \times 10^{13}$ GC total ($N = 3$ por dose) de rAAV1.hPGRN - ou veículo (ITFFB; $N = 2$). Os níveis de dose foram selecionados para serem equivalentes àqueles que devem ser avaliados no estudo de dose efetiva mínima planejada (MED) quando dimensionados pela massa cerebral (assumindo 0,4 g para o cérebro de camundongo e 90 g para o cérebro de macaco rhesus). Foram realizados exames neurológicos de linha de base, patologia clínica (contagens de células com diferenciais, substâncias químicas clínicas e um painel de coagulação), substância química do CSF e citologia do CSF. Após rAAV1.PGRN ou administração de veículo, os animais foram monitorados diariamente quanto aos sinais de angústia e comportamento anormal.

[00168] Avaliações de patologia clínica de sangue e CSF e exames neurológicos foram realizados semanalmente durante 30 dias após rAAV1.PGRN ou administração de veículo, seguido por cada 30 dias

daí em diante. Na linha de base e em cada ponto de tempo de 30 dias daí em diante, as respostas de anticorpos neutralizantes anti-AAV1 (Nabs) e de linfócitos T citotóxicos (CTL) para AAV1 e rAAV1. O produto do transgene PGRN foi avaliado por um ensaio de immunospot enzimático (ELISpot) de gama interferon (IFN- γ).

Espécies	<i>Macaca mulatta</i>
Sinônimo	Macacos Rhesus
Idade dos animais no início do estudo	3 – 8 anos
Peso dos animais no início do estudo	3,0-10,0 kg
Número de animais usados	Total de 11 6 Machos 5 Fêmeas

Designação de Grupo	1	2	3	4
rAAV1.PGRN/ITFFB	Veículo (ITFFB)	rA-AV1.PGRN	rA-AV1.PGRN	rA-AV1.PGRN
rAAV1.Dose de PGRN (GC)	N/A	$3,0 \times 10^{12}$	$1,0 \times 10^{13}$	$3,0 \times 10^{13}$
Número de Macacos	2	3	3	3
Sexo	Ambos	Ambos	Ambos	Ambos
ROA	ICM	ICM	ICM	ICM
Volume de Administração (mL)	Até 2,0	Até 2,0	Até 2,0	Até 2,0
Dia da Necrópsia	90 $\pm$ 5	90 $\pm$ 5	90 $\pm$ 5	90 $\pm$ 5

[00169] Noventa dias após rAAV1.Administração de PGRN ou veículo, os animais foram sacrificados e os tecidos foram colhidos para um exame histopatológico microscópico abrangente. Além disso, os linfócitos foram colhidos do fígado, baço e medula óssea para avaliar a presença de células T reativas tanto no capsídeo quanto no produto do

transgene nesses órgãos no momento da necropsia.

[00170] A biodistribuição do vetor foi avaliada por qPCR em amostras de tecido. Os genomas do vetor também foram quantificados em amostras de soro e CSF. A excreção do vetor foi avaliada pela análise dos genomas do vetor detectados na urina e nas fezes. Essas análises foram realizadas apenas para a coorte de dose mais alta porque estudos anteriores demonstraram que o padrão de distribuição do vetor após a administração de ICM é independente da dose, e doses de vetor mais altas geram um sinal geral maior no ensaio de biodistribuição baseado em qPCR, permitindo maior sensibilidade na detecção de deposição de vetores em tecidos alvos (Hordeaux et al., 2018b).

Avaliação de Velocidade de Condução do Nervo

[00171] Os animais foram sedados com uma combinação de cetamina/dexmedetomidina. Os animais sedados foram colocados em decúbito lateral ou dorsal em uma mesa de procedimento, com compressas térmicas para manter a temperatura corporal. Dispositivos de aquecimento eletrônico não foram recomendados devido ao potencial de interferência na aquisição de sinais elétricos.

[00172] Para estudos de condução do nervo sensorial (NCS), a sonda do estimulador foi posicionada sobre o nervo mediano com o catodo mais próximo do local de registro e dois eletrodos de agulha inseridos subcutaneamente no dígito II ao nível da falange distal (eletrodo de referência) e falange proximal (eletrodo de registro), enquanto o eletrodo de aterramento foi colocado próximo à sonda de estimulação (catodo). Foi usado um estimulador pediátrico. As respostas obtidas foram amplificadas diferencialmente e exibidas no monitor. A intensidade do estímulo de aquisição inicial foi definida para 0,0 mA para confirmar a falta de sinal elétrico de fundo. A fim de encontrar a localização ideal do estímulo, a intensidade do estímulo foi aumentada até 10,0 mA, e uma sequência de estímulos foi gerada enquanto a sonda

foi movida ao longo do nervo mediano até que a localização ideal fosse encontrada, como determinado por uma forma de onda definitiva. Mantendo a sonda no local ideal, a intensidade do estímulo foi aumentada progressivamente de forma gradativa até que a resposta de amplitude de pico não foi mais aumentada. Cada resposta ao estímulo foi registrada e salva no software. Até 10 estímulos máximos foram calculados e reportados para o nervo mediano. A distância (cm) do local de registro ao catodo de estimulação foi medida e inserida no software e a velocidade de condução foi calculada usando a latência de início da resposta e a distância (cm). Foram reportadas a velocidade de condução e a média da amplitude do potencial de ação do nervo sensorial (SNAP). O nervo mediano foi testado bilateralmente. Todos os dados brutos gerados pelo instrumento foram retidos como parte do arquivo do estudo.

[00173] As FIG. 11A e FIG. 11B mostram resultados dos estudos de condução do nervo sensorial mediano em NHPs. Não foram observados efeitos na condução do nervo sensorial mediano nas doses administradas. A análise histológica preliminar mostrou verificações principalmente dentro do DRG, TRG, tratos de substância branca dorsal da medula espinhal e nervos periféricos (FIG. 12A - FIG. 12D). Essas verificações consistiram em degeneração neuronal dentro do DRG/TRG e degeneração axonal (isto é, axonopatia) dentro dos tratos de substância branca dorsal da medula espinhal e nervos periféricos. No geral, esses resultados foram observados através de todos os grupos tratados; no entanto, a incidência e a gravidade tenderam a ser maiores em animais individuais dos grupos de dose média e alta em ambos os pontos de tempo.

[00174] Dada a gravidade da doença neurodegenerativa relacionada a *GRN*, o perfil de benefício/risco para a administração de ICM de rAAV1. Espera-se que o PGRN permaneça favorável.

Exemplo 7: Ensaio Humano

[00175] É realizado um estudo de escalonamento de dose Fase 1/2 de Primeiro em Humano FIH de uma única administração de rAAV1.hPGRN em pacientes com doença neurodegenerativa de início na idade adulta causada por mutações no gene GRN (ver tabela abaixo). rAAV1.hPGRN foi modificado para substituir o gene GRN. Este estudo FIH avalia a segurança e tolerabilidade, bem como coleta dados preliminares sobre a eficácia. Até 12 pacientes portadores da mutação GRN heterozigotos sintomáticos são tratados com rAAV1.hPGRN e inicialmente acompanhados por um período de 2 anos (24 meses), com acompanhamento contínuo de longo prazo por 5 anos após a dose. Este estudo fornece dados para apoiar o início de um estudo de registro que utiliza a dose máxima tolerada de fase 1/2 (MTD). Este estudo de registro avalia o efeito de rAAV1.hPGRN em desfechos clínicos e biomarcadores relevantes para a doença. Todos os ensaios incluem a administração de uma única dose de ICM de rAAV1.hPGRN em pacientes adultos com doença neurodegenerativa associada a GRN.

Título do(s) protocolo(s):	Um Estudo de Escalonamento de Dose Multicêntrico e de Rótulo Aberto de Fase 1/2 para Avaliar a Segurança e a Tolerabilidade de uma Dose Única de rAAV1.hPGRN Administrada na Cisterna Magna (ICM) de Pacientes Adultos com Doença Neurodegenerativa de Início na Idade Adulta Causada por Mutações Heterozigóticas no Gene Precursor de Granulina (<i>GRN</i>)
Número de Sujeitos	Até 12 sujeitos avaliáveis
Objetivos:	<i>Primário:</i> Para avaliar a segurança e tolerabilidade de rAAV1.hPGRN ao longo de 2 anos (24 meses) após a administração de uma única dose de ICM por meio da avaliação de:

	○ Eventos adversos (AEs) e eventos adversos graves (SAEs) ○ Sinais vitais e exames físicos ○ Eletrocardiogramas (ECGs) ○ Estudos de condução do nervo sensorial ○ Avaliações laboratoriais (substância química sérica, hematologia, estudos de coagulação, testes de função hepática [LFTs], urinálise e substância química e citologia do CSF) ○ Imunogenicidade do vetor e produto do transgene <i>Secundário (eficácia exploratória):</i> • Para avaliar a farmacodinâmica e a atividade biológica de rAAV1.hPGRN ao longo de 2 anos (24 meses) após a administração de uma única dose de ICM com base nos seguintes pontos finais: ○ Efeito de rAAV1.hPGRN nos níveis de proteína PGRN no CSF ○ Efeito de rAAV1.hPGRN nas mudanças na espessura cortical do cérebro
	• Para avaliar a eficácia de rAAV1.hPGRN ao longo de 2 anos (24 meses) após a administração de uma única dose de ICM medida por: ○ Efeito de rAAV1.hPGRN na sobrevida ○ Efeito de rAAV1.hPGRN sobre os sintomas clínicos e funcionamento diário, como avaliado pela soma das caixas de Miniexame do Estado Mental (MMSE), Impressão Clínica Global de Mudança (CGI-C), Bateria de Avaliação Frontal (FAB), Escala de Avaliação de Demência Frontotemporal (FRS), Inventário Comportamental Frontal (FBI), Escala de Classificação de Doença de Parkinson Unificada (UPDRS), Teste de Fluência Verbal, Es-

	cala de Avaliação Clínica de Demência para Degeneração Lobar Frontotemporal (CDR-FTLD sb) e Inventário Neuropsiquiátrico (NPI) <i>Exploratórias:</i> • Para avaliar ainda mais os efeitos farmacodinâmicos de rAAV1.hPGRN ao longo de 2 anos (24 meses) após a administração de uma única dose de ICM medida por: ○ Níveis de CSF de cadeia leve de neurofilamento (NFL), tau, tau fosforilada e marcadores inflamatórios ○ Níveis plasmáticos de PGRN
Projeto do estudo:	Este é um estudo de escalonamento de dose de Fase 1/2, FIH, multicêntrico, de rótulo aberto, de braço único de rAAV1.hPGRN administrado por uma única injeção de ICM em sujeitos adultos com doença neurodegenerativa de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de <i>GRN</i>. Segurança e tolerabilidade, farmacodinâmica e eficácia clínica são avaliadas ao longo de 2 anos, e todos os sujeitos são acompanhados durante 5 anos após a administração de rAAV1.hPGRN para a avaliação de longo prazo de segurança e tolerabilidade, farmacodinâmica e resultados clínicos. O estudo consiste em uma fase de triagem para determinar a elegibilidade de cada sujeito potencial aproximadamente do Dia -35 ao Dia -7. Após a confirmação da elegibilidade do sujeito e sua participação no estudo, o sujeito passa por avaliações de linha de base, que incluirão imagens de ressonância magnética do cérebro (MRI), LP para coleta de CSF, coleta de sangue, coleta de urina, sinais vitais, ECG, exame físico e avaliações clínicas. As avaliações de linha de base

	ocorrem entre o Dia -6 e o Dia 0 (inclusive) antes da administração de rAAV1.hPGRN. Durante a fase de tratamento, os sujeitos são admitidos no hospital na manhã do dia 1. Os sujeitos recebem uma dose única de ICM de rAAV1.hPGRN no Dia 1 e permanecem no hospital por pelo menos 24 horas após a dosagem para observação. As visitas de estudo subsequentes ocorrem no Dia 7, Dia 14, Dia 30 e 6 meses após a dosagem, seguido por cada 6 meses durante os primeiros 2 anos após a dosagem. As visitas de LTFU ocorrem por mais 3 anos com uma frequência de 12 meses, até 5 anos após a administração.
	O estudo consiste nas seguintes três coortes administradas com rAAV1.hPGRN como uma única injeção de ICM: • Coorte 1 (Dose Baixa): Três sujeitos elegíveis são sequencialmente inscritos e administrados com a dose baixa de rAAV1.hPGRN com um período de observação de segurança de 4 semanas entre cada sujeito. Se nenhum gatilho de revisão de segurança (SRTs) for observado, todos os dados de segurança disponíveis serão avaliados por um conselho de segurança 4 semanas após o terceiro sujeito da Coorte 1 receber rAAV1.hPGRN. • Coorte 2 (Dose Alta): Se for tomada a decisão de prosseguir, três sujeitos elegíveis são sequencialmente inscritos e administrados com a dose elevada de hAAV1.hPGRN com um período de observação de segurança de 4 semanas entre cada sujeito. Se nenhum SRT for observado, todos os dados de segurança disponíveis são avaliados pelo conselho de segurança 4 semanas após o terceiro sujeito da Coorte 2 ser administrado com rA-

	AV1.HPGRN. Coorte 3 (MTD): Enquanto se aguarda uma recomendação positiva do conselho de segurança, 6 sujeitos adicionais são inscritos e administrados com a dose MTD de rA-AV1.hPGRN. A dosagem não é escalonada com um período de observação de segurança de 4 semanas entre cada sujeito. Cumulativamente, uma inscrição total de 9 sujeitos na coorte de dose alta ou baixa e 12 sujeitos no total (em todas as doses) é antecipada.
Critérios de Inclusão:	1. ≥ 35 anos e ≤ 75 anos de idade na inscrição 2. Diagnóstico clínico confirmado de doença neurodegenerativa de início na idade adulta causada por mutação de GRN heterozigótica 3. Confirmação da mutação de GRN como causal por um dos seguintes critérios: a. Mutação classificada como patogênica pelo Base de Dados de Mutações em Doença de Alzheimer e Demência Frontotemporal (AD & FTDMDb) (AD & FTDMDb e Cruts, (2019). "Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database." Recuperado em 16 de janeiro de 2019, de www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/default.cfm?MT=1&ML=1&Page=MutByQuery&Query=tblContexts.GeneSymbol%20In%20(%20GRN%20)&Selection=Gene%20In%20(GRN).) Seguindo as diretrizes publicadas pelo American College of Medical Genetics (ACMG) (Richards et al., (2015). "Padrões e diretrizes para a interpretação de variantes de sequência: uma recomendação consensual conjunta do Colégio Americano de Genética Médica e Genômica e da Associação de Patologia Molecular." Genet Med. 17 (5): 405-24)

	b. Classificado como "natureza patogênica obscura" no AD & FDMDB ou "variante de significado incerto" pelas diretrizes da ACMG, e o paciente tem um histórico familiar da mesma doença neurodegenerativa ou relacionada 4. Pontuação global CDR-FTLD > 0,5 e ≤ 1
Critérios de Exclusão:	1. Incapacidade de fornecer consentimento total ou a falta de um cuidador legalmente autorizado com contato adequado que possa fornecer consentimento 2. Contraindicação para MRI, administração de ICM ou LP (por exemplo, infecção local, trombocitopenia, coagulopatia, pressão intracraniana elevada ([ICP] devido a uma lesão que ocupa espaço) 3. Classificação da mutação de <i>GRN</i> como "não patogênica", "provável variante benigna" ou "variante benigna" no AD e FDMDB 4. Pacientes imunocomprometidos 5. Pacientes com resultado de teste positivo para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou hepatite C 6. Outras doenças malignas ou distúrbios de SNC crônicos não causadas por mutação de <i>GRN</i> 7. Medicamentos que, na opinião do investigador, podem representar um risco para o paciente, como medicações imunossupressoras ou corticosteroides sistêmicos. Uso de fármaco anti-inflamatório não esteroide (NSAID) aceitável se em uma dose estável por 30 dias antes da triagem e concordar permanecer na mesma dose durante o ensaio 8. Neoplasia maligna (exceto câncer de pele localizado) ou um histórico documentado de síndrome de câncer hereditário. Os sujeitos

	com uma doença maligna previamente tratada com sucesso e um acompanhamento suficiente para excluir a recorrência (com base na opinião do oncologista) podem ser incluídos após discussão e aprovação pelo Patrocinador ou pessoa designada 9. Qualquer doença concomitante que, na opinião do investigador, pode causar prejuízo cognitivo não relacionado a mutações de <i>GRN</i>, incluindo neurosífilis, hidrocefalia, acidente vascular cerebral, doença isquêmica de pequenos vasos, hipotireoidismo não controlado ou deficiência de vitamina 10. Para fêmeas com potencial para engravidar, urina positiva confirmada por teste de gravidez de soro na consulta de triagem, urina positiva confirmada por resultado de soro no dia 1 antes da administração do produto experimental, ou falta de vontade de fazer testes de gravidez adicionais durante o estudo 11. Para machos e fêmeas com potencial para engravidar, indisposição para usar um método de contracepção de barreira dupla medicamente aceito (como um preservativo/diafragma usado com espermicida) ou se envolver em abstinência a partir da data da triagem até 52 semanas após a administração do vetor 12. Qualquer condição (por exemplo, histórico de qualquer doença, evidência de qualquer doença atual, qualquer verificação no exame físico ou qualquer anormalidade laboratorial) que, na opinião do investigador, colocaria o sujeito em risco indevido ou interferiria na avaliação do produto investigacional ou interpretação da segurança do sujeito ou resultados do estudo 13. Qualquer enfermidade aguda que exija hospitalização dentro de 30 dias de tratamento
--	--

Via de Administração e Procedimento

[00176] rAAV1.hPGRN como uma dose única é administrado no Dia 1 aos sujeitos por meio de injeção sub-occipital guiada por CT na cisterna magna. No Dia 1, uma seringa contendo 5,6 mL de rAAV1.hPGRN no título apropriado é preparada pela Farmácia Investigacional associada ao estudo e entregue na sala de procedimento.

[00177] Antes da administração do fármaco do estudo, o sujeito é anestesiado, intubado e o local da injeção é preparado e coberto com técnica estéril. Um LP é realizado para remover um volume pré-determinado de CSF, após o que contraste iodado é injetado IT para auxiliar na visualização da anatomia relevante da cisterna magna. O contraste IV pode ser administrado antes ou durante a inserção da agulha como uma alternativa ao contraste IT. A decisão de usar contraste IV ou IT fica a critério do intervencionista que realiza o procedimento. Uma agulha raquidiana (22–25 G) é introduzida na cisterna magna sob orientação fluoroscópica. Uma agulha introdutora maior pode ser usada para auxiliar na colocação da agulha. Após a confirmação da colocação da agulha, o conjunto de extensão é conectado à agulha raquidiana e pode ser preenchido com CSF. A critério do intervencionista, uma seringa contendo material de contraste pode ser conectada ao conjunto de extensão e uma pequena quantidade injetada para confirmar a colocação da agulha na cisterna magna. Após a colocação da agulha ser confirmada, a seringa contendo rAAV1.hPGRN é conectada ao conjunto de extensão. O conteúdo da seringa é injetado lentamente ao longo de 1–2 minutos, fornecendo um volume de 5,0 mL.

[00178] Avaliações de segurança, incluindo coleta de eventos adversos (AEs), exames físicos/neurológicos, sinais vitais, laboratório clínico (substância química do soro, hematologia, coagulação, LFTs, urinálise), ECGs, estudos de condução do nervo e citologia e substân-

cia química do CSF (contagens de células, proteína, glicose) são realizadas nos horários indicados no cronograma do estudo.

[00179] Nenhuma comparação estatística é planejada para avaliações de segurança; todos os resultados são apenas descritivos. Os dados são listados e as tabelas de resumo são produzidas.

[00180] As comparações estatísticas são realizadas quanto aos pontos finais secundários e exploratórios. As medições em cada ponto de tempo são comparadas aos valores da linha de base para cada sujeito, bem como dados de histórico natural de voluntários saudáveis e pacientes com GRN com características de coorte comparáveis, quando disponíveis para cada ponto final. Todos os dados são apresentados em listagens de dados do sujeito. Variáveis categóricas são sumarizadas usando frequências e porcentagens, e variáveis contínuas são sumarizadas usando estatísticas descritivas (número de observações não perdidas, média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo). As exibições gráficas são apresentadas como apropriado.

[00181] A apresentação clínica inicial da neurodegeneração de início na idade adulta causada pela haploinsuficiência de GRN é heterogênea. Essa heterogeneidade resulta em uma variedade de diagnósticos com sintomas adicionais emergindo, à medida que a doença progride. Em virtude de os pacientes geralmente diminuírem rapidamente após o início dos sintomas, os pacientes com qualquer diagnóstico de neurodegeneração podem ser tratados, desde que tenham uma mutação de GRN heterozigótica patogênica confirmada. Os pacientes podem ser classificados utilizando a pontuação global CDR-FTLD. Esta escala de classificação é modificada para avaliar a gravidade da doença em pacientes com diagnóstico de espectro de FTLD. Devido à sobreposição na sintomatologia relacionada ao FTLD para aqueles com outros diagnósticos relacionados ao GRN e ao número de domínios capturados na pontuação global CDR-FTLD (memória, orientação, jul-

gamento e solução de problemas, assuntos da comunidade, casa e hobbies, cuidados pessoais, comportamento e linguagem), esta escala pode ser usada para diagnósticos. Uma pontuação global CDR-FTLD maior que 0,5 (que inclui pacientes levemente sintomáticos) e menor ou igual a 1 permitiria o tratamento de pacientes sintomáticos em um estágio inicial de neurodegeneração em que os benefícios da terapia genética provavelmente seriam maximizados. O tratamento de pacientes nesta fase inicial permite a detecção subsequente de alterações ou estabilização na progressão da doença e atrasos no aparecimento de sintomas adicionais. No entanto, o requisito de uma pontuação global mínima de 0,5 CDR-FTLD nesta população impede a participação de diagnósticos proeminentes no motor, pois a escala não é otimizada para capturar deficiências nos fenótipos motores.

[00182] Não se espera que esta terapia genética resulte na expressão de PGRN acima dos níveis fisiológicos. Usando doses de rAAV1.hPGRN em estudos não clínicos de NHP que são maiores do que as doses que seriam usadas no ensaio FIH, PGRN foi observado ser expresso no soro em níveis próximos aos normais após a administração de rAAV1.hPGRN ICM. Em virtude de os sujeitos inscritos no estudo FIH terem inicialmente níveis circulantes de PGRN em aproximadamente 30% do normal, espera-se que os níveis circulantes de PGRN no soro possam ser restaurados ao normal. Os exames de sangue dos pacientes são avaliados por meio de painéis de hemograma completo (CBC), e os pacientes são monitorados para tumores por meio de MRI com contraste de gadolínio do cérebro e da espinha superior por 5 anos nos pontos de tempo de acompanhamento.

[00183] Além de medir a segurança e tolerabilidade como pontos finais primários, pontos finais de eficácia secundários e exploratórios foram escolhidos para este estudo com base na literatura atual e em consulta com os principais médicos especializados no estudo de neu-

rodegeneração relacionada a *GRN*. Esses pontos finais rastreiam resultados clínicos e biomarcadores de doenças com o objetivo de identificar pontos finais apropriados para um ensaio de registro subsequente.

[00184] Em virtude de a neurodegeneração causada por mutações *GRN* em última análise resultar em morte, o impacto de rAAV1.hPGRN na sobrevida do paciente também é um ponto final de eficácia para este estudo. No entanto, a duração do estudo e o tamanho da amostra podem não ser suficientes para demonstrar um benefício de sobrevida porque a maioria dos pacientes tem uma expectativa de vida de 7-11 anos a partir do início dos sintomas.

[00185] O efeito de rAAV1.hPGRN nos sintomas clínicos e no funcionamento diário dos pacientes é avaliado. Por causa da heterogeneidade fenotípica exibida pela população de pacientes alvos, escalas funcionais e clínicas que capturam a progressão dos sintomas expressos em toda a faixa de apresentações clínicas são empregadas. O estudo proposto utiliza o FAB, FRS, MMSE, CGI-C, NPI e FBI para medir as mudanças ao longo do tempo. Essas escalas medem principalmente a cognição, a linguagem, os comportamentos neuropsicológicos e as capacidades relacionadas às funções diárias que informam sobre a progressão ou estabilização das várias apresentações clínicas da doença. UPDRS também está incluído para capturar mudanças nos sintomas motores. No FIH, essas avaliações de eficácia são exploratórias por natureza e pretendem capturar, ao longo do tempo, a capacidade do rAAV.hPGRN de estabilizar o declínio dos sintomas. Os dados do FIH sobre a taxa de declínio adicional entre os vários parâmetros clínicos em pacientes com diferentes apresentações clínicas são usados para informar ainda mais a seleção de pontos finais apropriados e definir alterações clinicamente significativas para o estudo de registro.

[00186] Cada escala clínica é brevemente descrita abaixo:

Escalas Clínicas Medindo Basicamente a Função Cognitiva

[00187] CDR-FTLD: O CDR-FTLD é uma versão estendida da escala clássica de classificação de demência clínica (CDR), que é historicamente usada para classificar a gravidade dos distúrbios do espectro da AD. A avaliação inclui os seis domínios originais do CDR (memória, orientação, julgamento e resolução de problemas, assuntos comunitários, casa e hobbies, cuidados pessoais). Também inclui os dois domínios adicionais de linguagem e comportamento, o que permite mais sensibilidade na detecção de declínio em pacientes do espectro de FTLD. Uma pontuação de classificação de 0 indica comportamento ou linguagem normal, enquanto pontuações de 1, 2 ou 3 indicam déficits leves a graves. Para a soma de caixas CDR-FTLD (CDR-FTLD sb) representa a soma dos domínios individuais e é usado para determinar a gravidade da demência global.

[00188] MMSE: O MMSE é uma avaliação cognitiva global de 11 perguntas amplamente utilizada na prática clínica e de pesquisa. Perguntas tal como "Qual é o ano? Estação? Data? Dia da semana? Mês?" são feitas e um ponto é dado para cada resposta correta, com pontuação máxima fornecida para cada questão. A pontuação máxima total é 30, com dois pontos de corte nas pontuações 24 e 27. Esses pontos de corte são indicadores de declínio cognitivo.

[00189] Teste de Fluência Verbal: Embora não seja um dos pontos finais de eficácia exploratória propostos, o teste de fluência verbal é realizado durante todo o estudo FIH. É provável que isso seja feito apresentando a mesma imagem a cada sujeito e pedindo uma descrição verbal. Durante a descrição, a taxa de fala (palavras/minuto) é contada, registrada e, finalmente, comparada às taxas refletivas de adultos neurotípicos.

Escalas Clínicas Medindo Basicamente a Função Motora

[00190] UPDRS: é uma avaliação de 42 itens e quatro partes de

vários domínios relacionados ao parquinhoismo, tais como atividade mental, comportamento e humor e atividades da vida Diária. Cada item inclui uma escala de classificação variando de 0 (indicando nenhum prejuízo) a 4 (indicando o prejuízo mais grave). As pontuações de cada parte são computadas para fornecer uma indicação da gravidade da doença com uma pontuação alta de 199 indicando a incapacidade mais grave.

Escalas Clínicas Medindo Basicamente o Comportamento

[00191] NPI: é usado para elucidar a presença de psicopatologia em pacientes com distúrbios cerebrais. Inicialmente, ele foi desenvolvido para uso em populações com AD; no entanto, acredita-se que seja útil para avaliar mudanças comportamentais em outras condições. A avaliação consiste em 10 domínios comportamentais e duas áreas neurovegetativas, dentro das quais existem quatro pontuações: frequência, gravidade, desgaste total, desgaste do cuidador. A pontuação total do NPI é obtida somando as pontuações dos domínios comportamentais, e subtraindo as pontuações de desgaste do cuidador.

[00192] FBI: O FBI é uma avaliação de 24 itens de mudanças no comportamento e personalidade associadas especificamente com bvFTD e para diferenciar entre bvFTD e outras demências. Ele é administrado como uma entrevista face a face com o cuidador principal, pois os pacientes com diagnóstico de bvFTD geralmente não têm critério suficiente sobre esses tipos de mudanças. Ele se concentra em várias áreas relacionadas ao comportamento e à personalidade, pontuando cada pergunta de 0 (nenhuma) a 3 (grave/na maioria das vezes). A pontuação total normalmente se correlaciona com a gravidade da doença e pode ser usada para avaliar as mudanças ao longo do tempo.

Escalas Clínicas Medindo a Função tanto Cognitiva quanto Motora

[00193] CGI-C: O CGI-C é uma das três partes de uma avaliação

breve e amplamente usada. Ele é composto por três itens avaliados pelo médico. O CGI-C é classificado em uma escala de 7 pontos, variando de 1 (muito melhorado) a 7 (muito pior) a partir da inscrição no estudo, independentemente de qualquer melhoria ser ou não inteiramente devida ao tratamento.

[00194] FAB: O FAB é uma breve avaliação para auxiliar na diferenciação entre as demências com fenótipo disexecutivo frontal e as do tipo AD. É particularmente útil em pacientes com demência leve (MMSE > 24). A avaliação consiste em seis partes que abordam as áreas cognitivas, motoras e comportamentais. Uma pontuação total de 18 ou mais indica melhor desempenho.

[00195] FDR: O FDR é uma breve avaliação de estadiamento para pacientes com diagnóstico de um subtipo de demência frontotemporal (FTD) (isto é, bvFTD ou qualquer um dos subtipos de PPA). O FDR detecta diferenças na progressão da doença para FTD ao longo do tempo. Esta breve entrevista é conduzida com o cuidador principal e consiste em 30 itens que são categorizados como ocorrendo "Nunca", "Às vezes" ou "Sempre". Uma pontuação de porcentagem é então calculada e convertida em uma pontuação logit e, por fim, em uma pontuação de gravidade. A pontuação de gravidade varia de "muito leve" a "profunda".

[00196] Escala de Avaliação de Gravidade de Suicídio de Columbia (C-SSRS): Embora a pontuação C-SSRS não seja um parâmetro de avaliação de eficácia exploratória para o FIH, essa avaliação é realizada ao longo do estudo. O C-SSRS é uma escala de três partes que mede a ideação suicida, a intensidade da ideação e o comportamento suicida. O resultado dessa avaliação é composto de uma classificação de letalidade de comportamento suicida tirada diretamente da escala, uma pontuação de ideação suicida, e uma classificação de intensidade de ideação suicida. Uma pontuação de ideação maior que 0 pode indi-

car a necessidade de intervenção com base nas diretrizes de avaliação. A classificação de intensidade varia de 0 a 25, com 0 representando nenhum endosso de ideação suicida.

[00197] Como um ponto final exploratório adicional, a sobrevida do paciente é avaliada. No entanto, os pacientes com diagnóstico de neurodegeneração causada por mutações de *GRN* têm uma expectativa de vida de 7-11 anos a partir do início dos sintomas. Como tal, a duração do estudo, o tamanho da amostra e a inclusão de sujeitos que estão na fase inicial da doença podem não ser suficientes para demonstrar um benefício de sobrevida.

[00198] A administração de rAAV1.hPGRN estabiliza o declínio na atrofia (perda de células neuronais) principalmente nos lobos corticais frontais e temporais e o volume cerebral total ao longo do tempo causado pela haploinsuficiência associada a *GRN*. MRI pode ser usada para rastrear mudanças na espessura do córtex frontal médio e regiões parietais.

[00199] Biomarcadores bioquímicos também são avaliados. Os níveis de proteína PGRN no CSF e no plasma são medidos como uma leitura da transdução de AAV, e aumentam em pacientes após a administração de rAAV1.hPGRN. Os níveis de CSF de cadeia leve de neurofilamento (NFL), tau, tau fosforilada e outros marcadores inflamatórios também são rastreados. A NFL é considerada um indicador geral de perda ou dano neuronal. Tau e tau fosforilada são associadas a patologia observada em AD, PD e algumas formas de FTD.

[00200] Os exames de sangue dos pacientes são avaliados por meio de painéis de hemograma completo (CBC), e os pacientes são monitorados quanto aos tumores por meio de MRI com contraste de gadolínio do cérebro e da espinha superior por 5 anos nos pontos de tempo de acompanhamento.

[00201] Uma única administração de rAAV1.hPGRN é segura e to-

lerável após a administração. Uma única administração de rA-AV1.hPGRN melhora a sobrevida e/ou reduz a progressão da doença como avaliado pelos sintomas clínicos e funcionamento diário dos pacientes. O tratamento retarda a perda da função neurocognitiva.

Listagem de Sequência de Texto Livre

[00202] As informações a seguir são fornecidas para sequências contendo texto livre em identificador numérico <223>.

SEQ ID NO	Texto livre sob <223>
3	<223> Sequência de codificação de PGRN1 humano modificada
4	<223> sequência de codificação de hPGRN2 modificada <220> <221> CDS <222> (1) .. (1779)
5	<223> Construto Sintético
6	<223> globina de coelho poliA
7	<223> ITR 3' de AAV
8	<223> ITR 5' de AAV
9	<223> intensificador de CMV IE humano
10	<223> promotor CB
11	<223> íntron quimérico
12	<223> Promotor UbC
13	<223> íntron
14	<223> SV40 poliA tardio
15	<223> Gene de resistência à ampicilina
16	<223> origem COL E1
17	<223> Promotor EF-1a
18	<223> F1 ori
19	<223> Gene de resistência à canamicina
20	<223> Promotor P5
21	<223> Promotor LacZ

22	<223> EF1a.huPGRN.SV40 <220> <221> repeat_region <222> (1)..(130)
23	<223> Ubc.PI.huPGRN.SV40
24	<223> CB7.CI.hPGRN1.rBG <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> intensificador de CMV IE <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> promotor de beta-actina de frango <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> íntron quimérico <220> <221> misc_feature <222> (1942) .. (3726) <223> hPGRN <220>

	<221> misc_feature <222> (3787) .. (3913) <223> beta globina de coelho poli A <220> <221> misc_feature <222> (4002) .. (4131) <223> ITR 3'
25	<223> gene AAV1 VP1 <220> <221> CDS <222> (1) .. (2208)
26	<223> Construto Sintético
27	<223> Rep AAV2
28	<223> gene VP1 da capsídeo de AAV5 <220> <221> CDS <222> (1) .. (2172)
29	<223> Construto Sintético
30	<223> capsídeo AAVhu68 VP1 <220> <221> CDS <222> (1) .. (2211)
31	<223> Construto Sintético
32	<223> sequência alvo de miRNA
33	<223> sequência alvo de miRNA
34	<223> sequência alvo de miRNA
35	<223> sequência alvo de miRNA

[00203] Todos os documentos citados neste relatório descritivo estão incorporados neste documento por referência. O Pedido de Patente Provisório dos US No. 62/809.329, depositado em 22 de fevereiro

de 2019, o Pedido de Patente Provisório dos US No. 62/923.812, depositado em 21 de outubro de 2019, e o Pedido de Patente Provisório dos US No. 62/969.108, depositado em 2 de fevereiro de 2020, estão incorporados por referência em sua totalidade, junto com suas listagens de sequência. A listagem de sequências depositada neste documento com o nome "18-8663PCT_ST25.txt" e as sequências e o texto neste documento estão incorporados por referência. Embora a invenção tenha sido descrita com referência a modalidades particulares, será percebido que modificações podem ser feitas sem se afastar do espírito da invenção. Tais modificações destinadas a cair no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus adeno-associado (AAV) recombinante (rAAV), caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) um capsídeo de AAV do vírus adeno-associado 1, e
- (b) um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas (ITRs) de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

2. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação codifica a proteína progranulina humana de SEQ ID NO: 1.

3. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência de codificação da progranulina é SEQ ID NO: 3 ou uma sequência pelo menos 95% a 99,9% idêntica à mesma.

4. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende um promotor, um intensificador, um íntron, uma sequência de codificação de progranulina humana e um sinal de poliadenilação.

5. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o íntron consiste em um doador de splice de beta actina de galinha e um elemento acceptor de splice β de coelho.

6. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que as repetições terminais invertidas de AAV (ITRs) são uma ITR 5' de AAV2 e uma ITR 3' de AAV2 que flanqueiam a sequência de codificação de progranulina e as sequências reguladoras.

7. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende (a) um promotor EF-1a e um poli A tardio de SV40, (b) um promotor UbC, um íntron e um poli A tardio de SV40, ou (c) um promotor CB7, um íntron quimérico e uma globina poli A de coelho.

8. Vírus adeno-associado recombinante (rAAV). de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende uma sequência de SEQ ID NO: 24.

9. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato que compreende um líquido aquoso adequado para administração intratecal e um AAV recombinante (rAAV) adequado para uso no tratamento de neurodegeneração causada por haploinsuficiência de GRN, o dito rAAV compreendendo:

(a) um capsídeo de AAV do vírus adeno-associado 1, e
(b) um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas (ITRs) de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a sequência de codificação codifica a proteína progranulina humana de SEQ ID NO: 1.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizada pelo fato de que a sequência de codificação da progranulina é SEQ ID NO: 3 ou uma sequência pelo menos 95% a 99,9% idêntica à mesma ao longo de pelo menos 18-593 aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizada pelo fato de que o genoma do vetor com-

preende um promotor, um intensificador, um íntron, uma sequência de codificação de progranulina humana e um sinal de poliadenilação.

13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizada pelo fato de que o íntron consiste em um doador de splice de beta actina de galinha e um elemento acceptor de splice β de coelho.

14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 13, caracterizada pelo fato de que repetições terminais invertidas de AAV (ITRs) são uma ITR 5' de AAV2 e uma ITR 3' de AAV2 que flanqueiam a sequência de codificação de progranulina e as sequências reguladoras de genoma do vetor.

15. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 14, caracterizada pelo fato de que o genoma do vetor compreende (a) um promotor EF-1a e um poli A tardio de SV40, (b) um promotor UbC, um íntron e um poli A tardio de SV40, ou (c) um promotor CB7, um íntron quimérico e uma globina poli A de coelho.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o genoma do vetor compreende uma sequência de SEQ ID NO: 24.

17. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 16, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um fluido cerebroespinal artificial com um tensoativo.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o tensoativo é Pluronic F-68.

19. Vírus adeno-associado (AAV) recombinante (rAAV), de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18, caracterizado pelo fato de que é para uso em um método para o tratamento de um paciente com neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de GRN.

20. Uso do vírus adeno-associado (AAV) recombinante (rAAV), como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 9 a 18, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para o tratamento de um paciente com neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de GRN.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que a composição é formulada para ser administrada uma dose de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral a $3,33 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral do rAAV intratecalmente.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o paciente é um adulto humano e é administrado com uma dose de $1,44 \times 10^{13}$ a $4,33 \times 10^{14}$ GC do rAAV.

23. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 22, caracterizado pelo fato de que o rAAV ou composição é administrável em um regime que compreende ainda um ou mais de (a) avaliação não invasiva do paciente para redução de lesões de armazenamento retiniano como um preditor de redução de lesões do cérebro, (b) realização de imagem de ressonância magnética para avaliar o volume do cérebro, e/ou (b) medição da concentração da concentração de progranulina no CSF.

24. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, caracterizado pelo fato de que o rAAV que compreende a sequência de codificação para progranulina é administrado por via intratecal, por via intracerebroventricular ou por via intraparenquimal.

25. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 23, caracterizado pelo fato de que a composição é administrada como uma dose única por meio de uma injeção sub-occipital guiada por tomografia computadorizada (CT-) na cisterna magna (intracisterna magna).

26. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19 a 25, caracterizado pelo fato de que o paciente tem progranulina - demência frontotemporal.

27. Método de tratamento de um paciente humano com neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de granulina (GRN), caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao sistema nervoso central (SNC) de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) com um capsídeo de AAV do vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação de progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

28. Método de tratamento de um paciente humano com neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de granulina (GRN), caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao sistema nervoso central (SNC) de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) com um capsídeo de AAV do vírus adeno-associado 1 (AAV1) que tem como alvo células ependimais, o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação de progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina nas células ependimais.

29. Método de tratamento de um paciente humano com lesões cerebrais associadas com neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de granulina, caracterizado pelo fato de que compreende a administração ao sistema nervoso central de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) com um capsídeo de AAV do vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreen-

dendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação de progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

30. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 29, caracterizado pelo fato de que é administrado ao paciente um rAAV, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, ou uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 9 a 18.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 30, caracterizado pelo fato de que o paciente é administrado com uma dose de 1×10^{10} GC/g de massa cerebral a $3,33 \times 10^{11}$ GC/g de massa cerebral do rAAV intratecalmente.

32. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 30, caracterizado pelo fato de que o paciente é um adulto humano e é administrado com uma dose de $1,44 \times 10^{13}$ a $4,33 \times 10^{14}$ GC do rAAV.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 32, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ou mais de (a) avaliação não invasiva do paciente quanto à redução de lesões de armazenamento retiniano como um preditor de redução de lesões cerebrais, (b) realização de imagem por ressonância magnética para avaliar o volume cerebral e/ou (c) medir a concentração da concentração de progranulina no CSF.

34. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 33, caracterizado pelo fato de que o rAAV que compreende a sequência de codificação para progranulina é administrado por via intratecal, por via intracerebroventricular ou por via intraparenquimal.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 33, caracterizado pelo fato de que o rAAV é administrado

como uma dose única por meio de uma injeção sub-occipital guiada por tomografia computadorizada (CT-) na cisterna magna (intracisterna magna).

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 27 a 35, caracterizado pelo fato de que o paciente tem demência frontotemporal (FTD) relacionada à progranulina.

FIG. 1

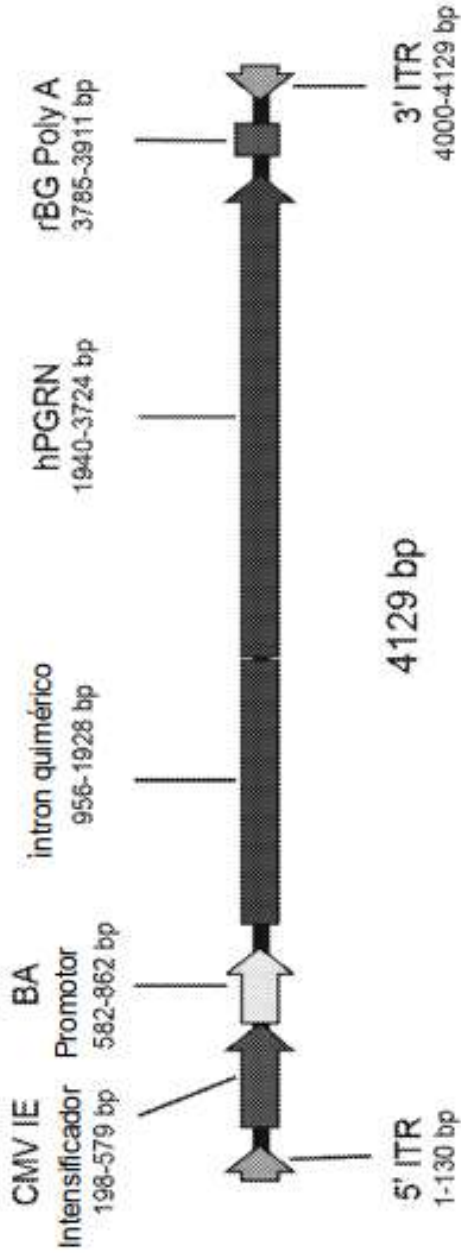
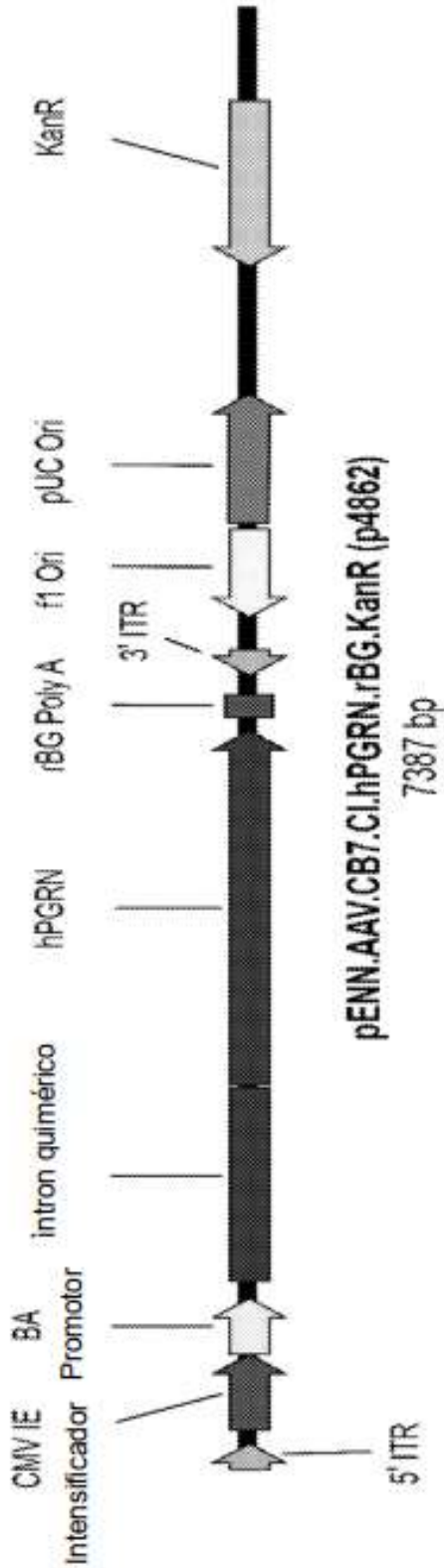


FIG. 2



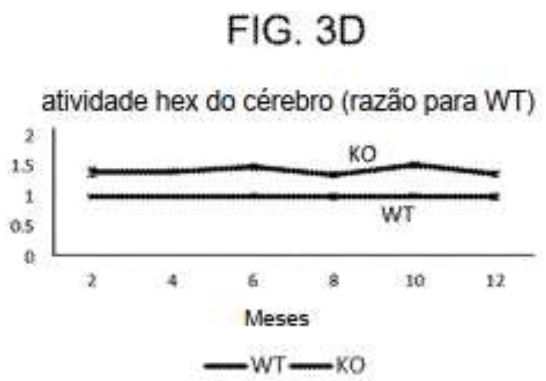
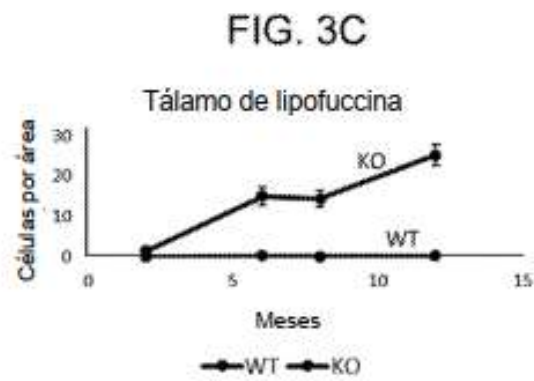
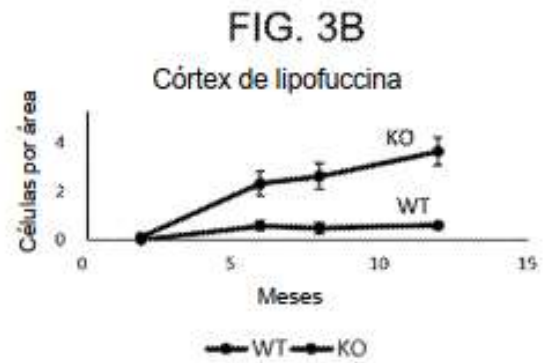
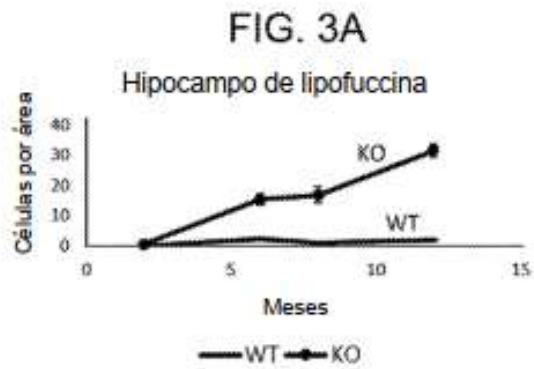


FIG. 4A

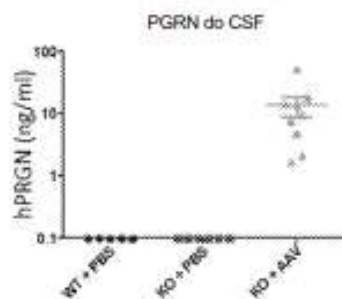


FIG. 4B

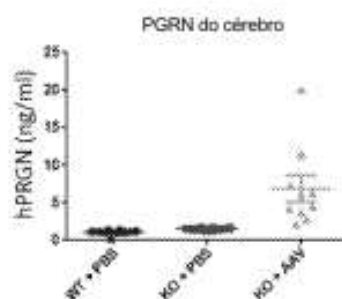


FIG. 4C

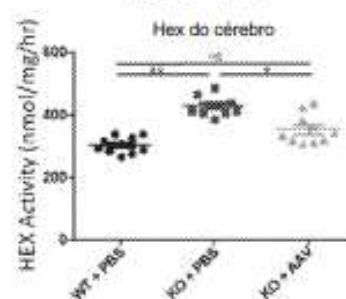


FIG. 4D

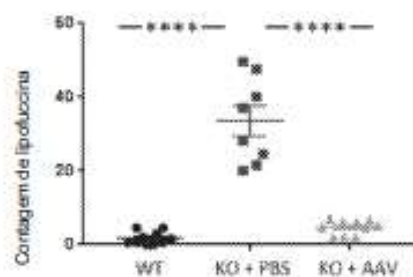


FIG. 4E

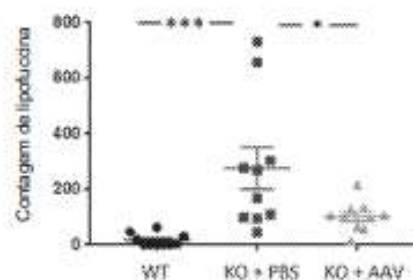


FIG. 4F

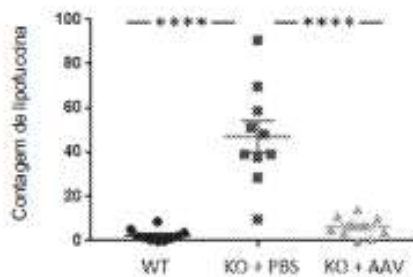


FIG. 4G

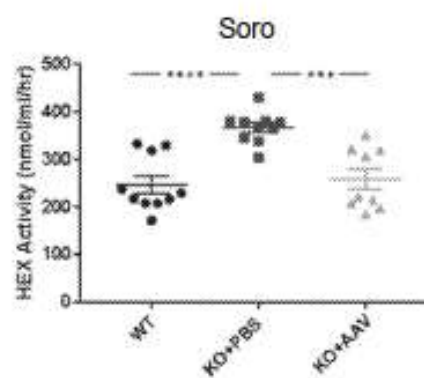


FIG. 5A

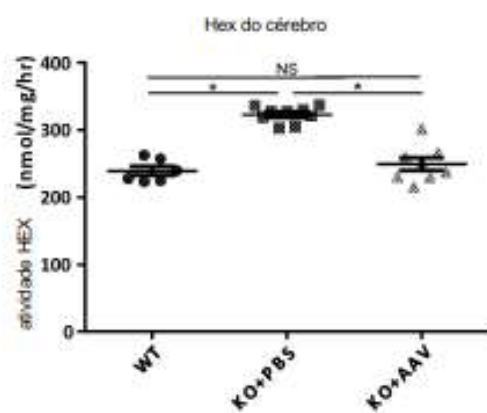


FIG.

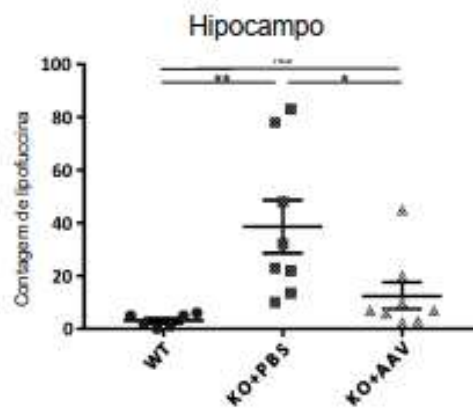


FIG. 5C

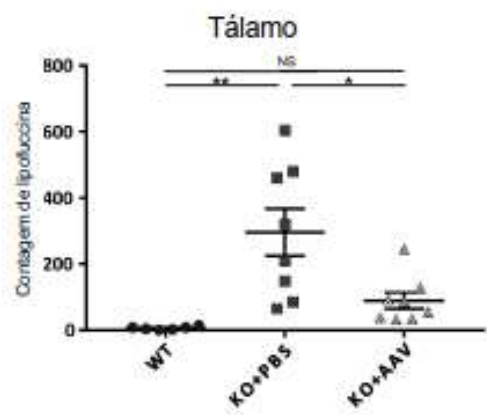


FIG. 5D

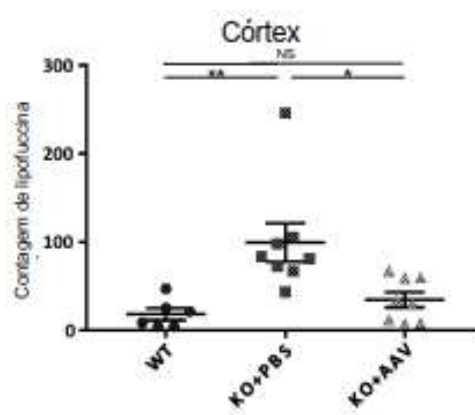


FIG. 6A

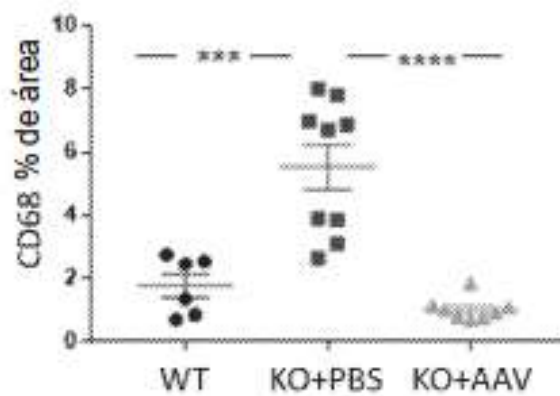


FIG. 6B

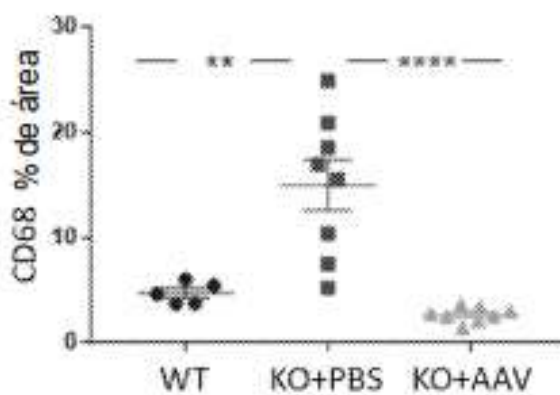
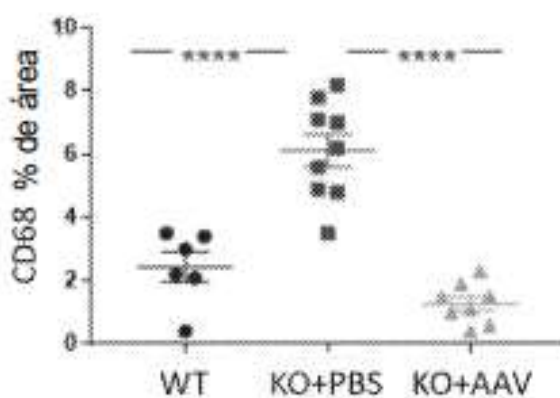
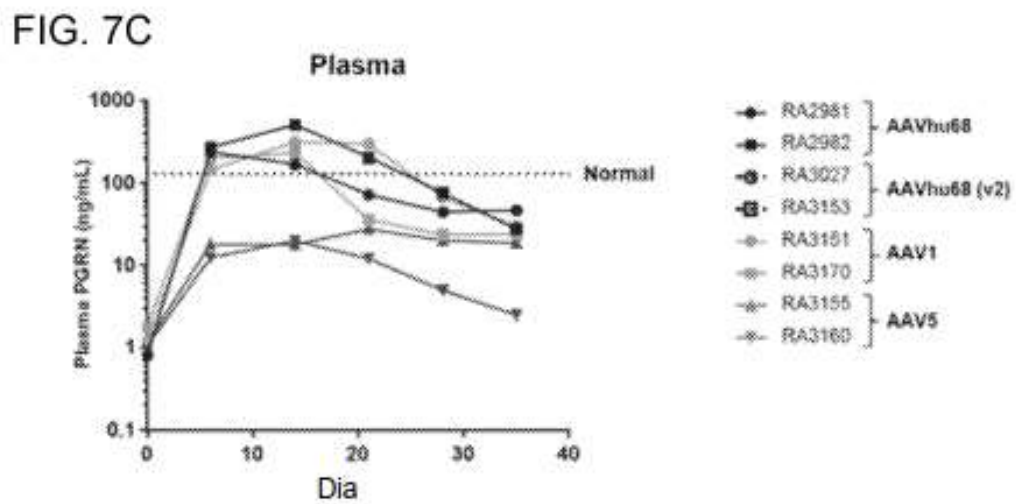
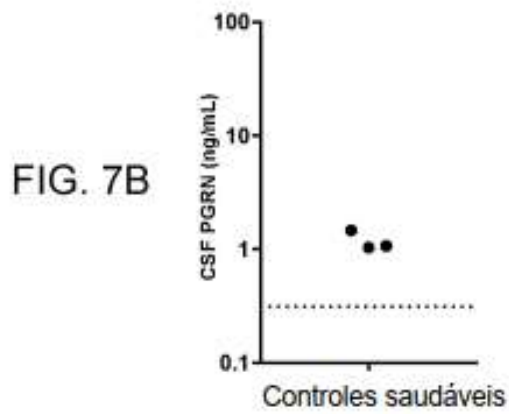
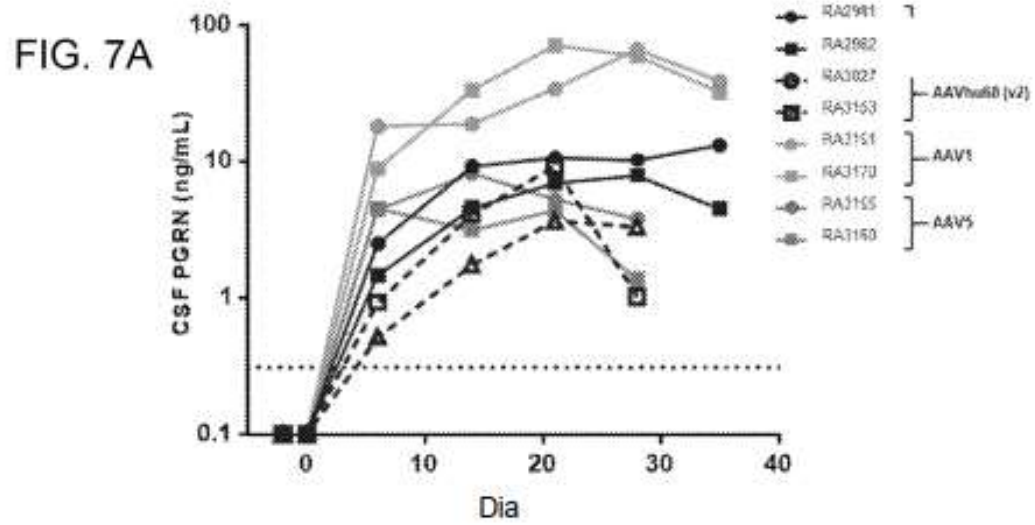


FIG. 6C





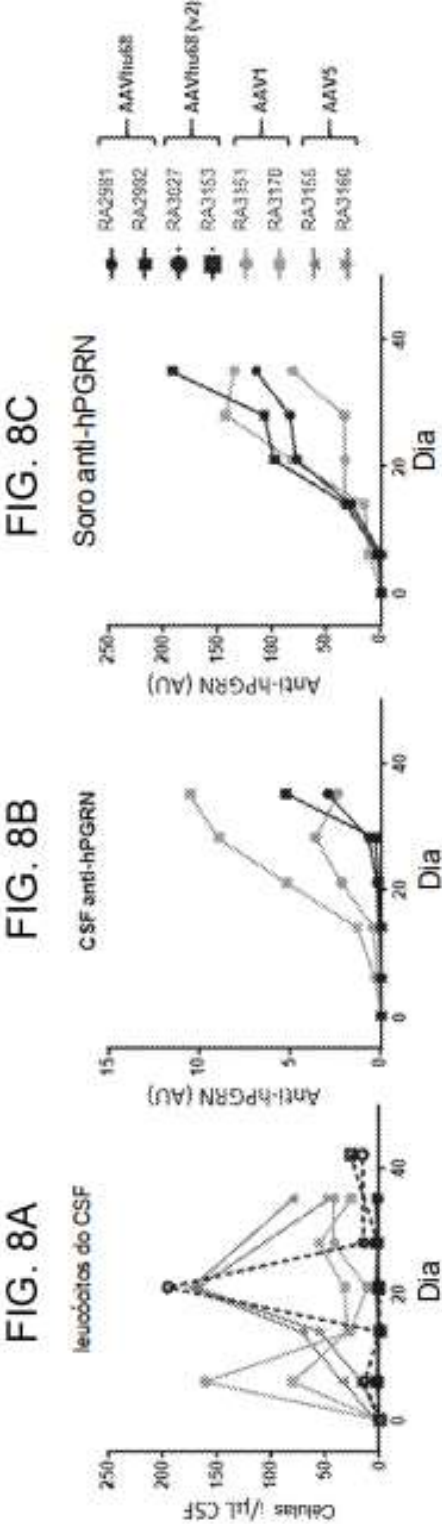


FIG. 9

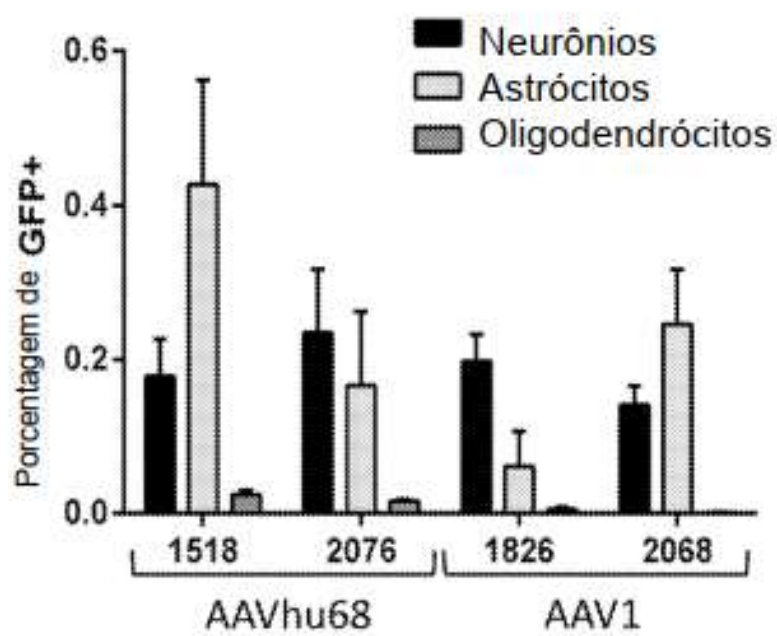


FIG. 10

		Região						
Marcador celular	ID do animal	1	2	3	4	5		Média
NeuN	1518	0.13	N/A	0.205	0.34	0.167	0.049	0.178
	2076	0.106	0.227	0.258	0.528	0.053	N/A	0.234
	1826	0.1	0.318	0.195	0.202	0.171	N/A	0.197
	2068	0.218	N/A	0.153	0.141	0.128	0.065	0.141
GFAP	1518	0.152	N/A	0.202	0.914	0.39	0.476	0.427
	2076	0.011	0.064	0.235	0.511	0.011	N/A	0.166
	1826	0.019	0.013	0.021	0.244	0.007	N/A	0.061
	2068	0.066	N/A	0.245	0.13	0.459	0.33	0.246
Olig2	1518	0.02	N/A	0.03	0.04	0.009	0.023	0.024
	2076	0.02	0.023	0.011	0.013	0.013	N/A	0.016
	1826	0	0.001	0.008	0.016	N/A	0.001	0.005
	2068	0.002	0	N/A	0.001	0.002	0.002	0.001

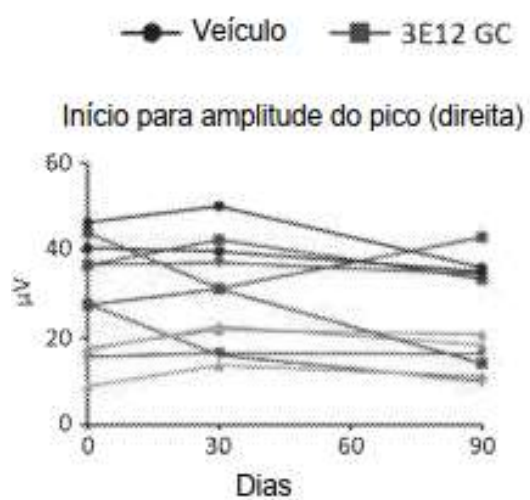


FIG. 11A

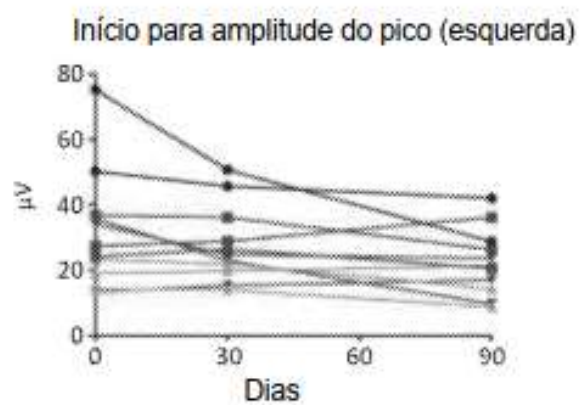


FIG. 11B

FIG. 12A

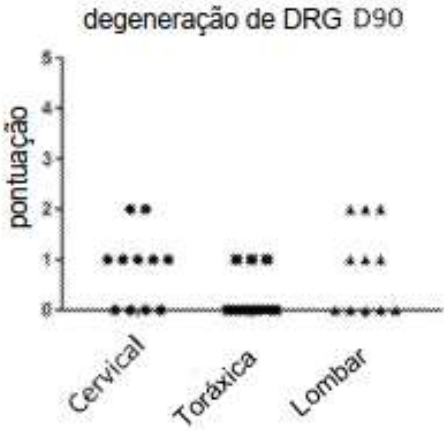


FIG. 12B

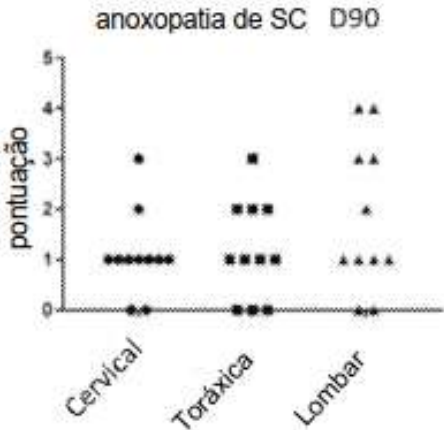


FIG. 12C

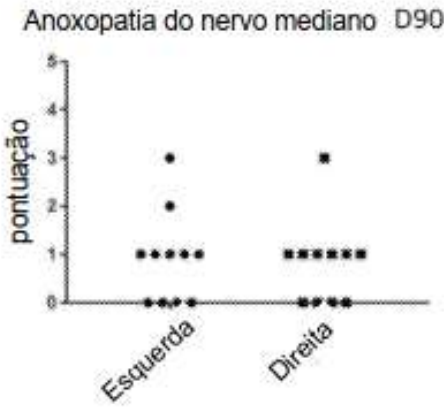


FIG. 12D



FIG. 13

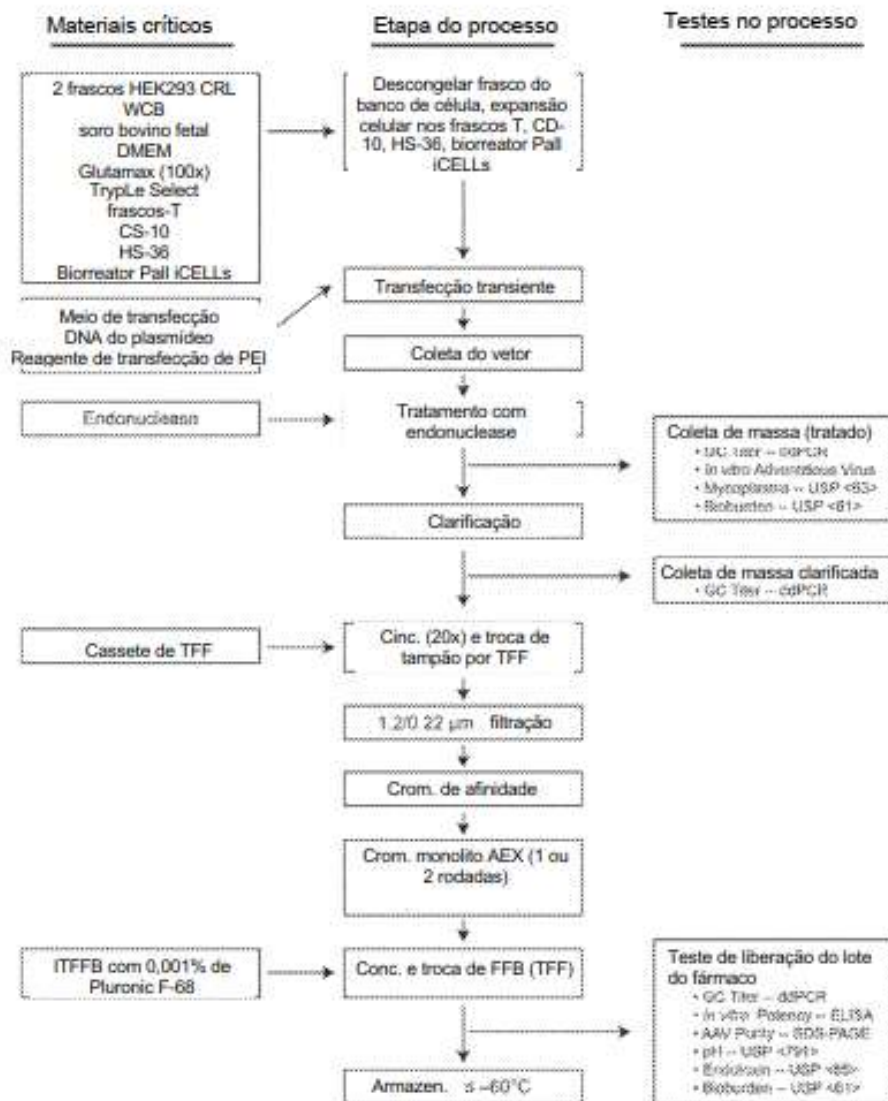
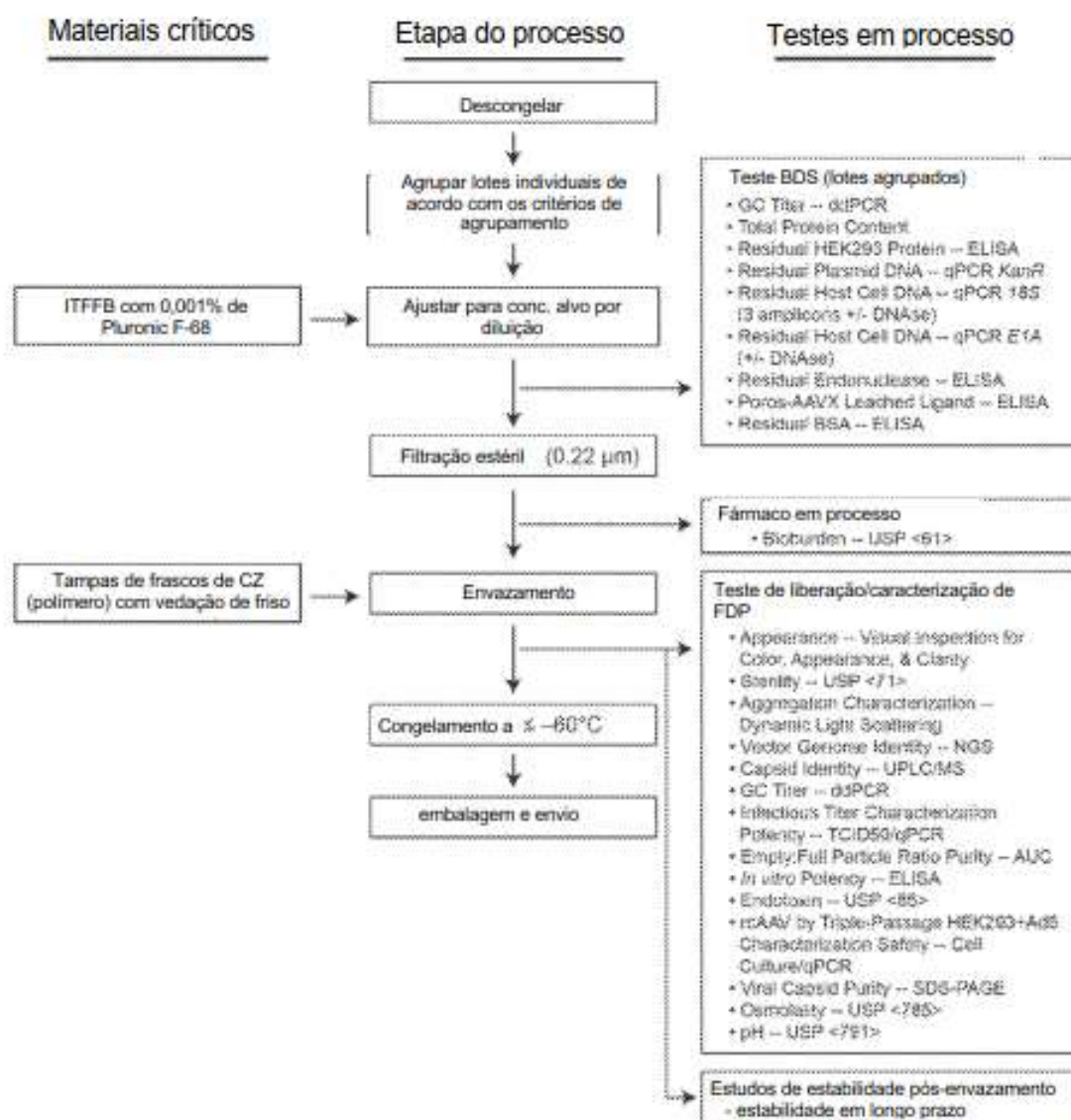


FIG. 14



RESUMO

Patente de Invenção: **"VÍRUS ADENO-ASSOCIADO RECOMBINANTE PARA TRATAMENTO DE NEURODEGENERAÇÃO COM INÍCIO NA IDADE ADULTA ASSOCIADO A GRN".**

É fornecido um AAV recombinante (rAAV) adequado para uso no tratamento da neurodegeneração de início na idade adulta causada pela haploinsuficiência de granulina (GRN), tal como a demência frontotemporal (FTD) relacionada à progranulina (PGRN). O rAAV compreende (a) um capsídeo de vírus adeno-associado 1 e (b) um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina. São também fornecidos um método para tratar um paciente humano com PGRN-FTD e outra neurodegeneração de início na idade adulta causada por haploinsuficiência de granulina (GRN), compreendendo a administração ao sistema nervoso central (SNC) de um vírus adeno-associado recombinante (rAAV) com um capsídeo de vírus adeno-associado 1 (AAV1), o dito rAAV compreendendo ainda um genoma de vetor empacotado no capsídeo de AAV, o dito genoma de vetor compreendendo repetições terminais invertidas de AAV, uma sequência de codificação para progranulina humana e sequências reguladoras que direcionam a expressão da progranulina.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P255069 ListSeq.txt
- Data de Geração do Código: 11/08/2021
- Hora de Geração do Código: 14:47:42
- Código de Controle:
 - Campo 1: 4C3153E3BAE297C3
 - Campo 2: 0D3D1620A05B292C