



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

(11) BR 112014028666-3 B1



(22) Data do Depósito: 14/03/2013

(45) Data de Concessão: 07/12/2021

(54) Título: USO DE UMA PARTÍCULA DE RAAV2, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E KIT

(51) Int.Cl.: C12N 15/861.

(30) Prioridade Unionista: 18/05/2012 US 61/648,801.

(73) Titular(es): THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION; UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION.

(72) Inventor(es): BEVERLY L. DAVIDSON; BRADLEY T. HYMAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2013031725 de 14/03/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/172964 de 21/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/11/2014

(57) Resumo: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA O TRATAMENTO DE DEPÓSITOS AMILOIDES. A presente invenção refere-se a métodos de aplicação de uma isoforma de ApoE de proteção ao sistema nervoso central de um mamífero, os quais compreendem a administração ao fluido cerebrospinal (CSF) do mamífero de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica a isoforma de ApoE de proteção inserida entre um par de repetições terminais invertidas do AAV de uma maneira eficaz para infectar células ependimais no mamífero não roedor de maneira tal que as células ependimais secretam ApoE no CSF do mamífero.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "USO DE UMA PARTÍCULA DE rAAV2, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E KIT".

PEDIDOS DE PATENTE CORRELATOS

[0001] O presente pedido de patente reivindica o benefício de prioridade do Pedido de Patente US 61/648,801, depositado em 18 de maio de 2012, pedido esse que é aqui incorporado a título de referência.

APOIO DE VERBA FEDERAL

[0002] A presente invenção foi realizada com o apoio do governo sob a verba numerada HD33531 e RC1AG036265 concedida pelos Institutos Nacionais de Saúde. O governo tem determinados direitos sobre a invenção.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[0003] O presente pedido contém uma listagem de sequências que foi enviada no formato ASCII através de EFS-Web e foi aqui incorporada a título de referência em sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 12 de março de 2013, foi nomeada 17023.122WO1.txt e tem um tamanho de 20.234 bytes.

ANTECEDENTES

[0004] A transferência genética é agora extensamente reconhecida como uma poderosa ferramenta para a análise de eventos biológicos e de processos de doença em nível celular e molecular. Mais recentemente, a aplicação de terapia genética para o tratamento de doenças humanas, quer sejam herdadas (por exemplo, deficiência de adenosina deaminase) ou adquiridas (por exemplo, câncer ou doença infecciosa), recebeu atenção considerável. Com o advento de técnicas incrementadas de transferência genética e de identificação de uma biblioteca de doenças relacionadas a genes defeituosos sempre em expansão, a terapia genética evoluiu

rapidamente de uma teoria de tratamento a uma realidade prática.

[0005] Tradicionalmente, a terapia genética foi definida como um procedimento em que um gene exógeno é introduzido nas células de um paciente a fim de corrigir um erro genético congênito. Mais recentemente, a terapia genética foi definida amplamente como a correção de um fenótipo da doença através da introdução de novas informações genéticas no organismo afetado. Na terapia genética *in vivo*, um gene transferido é introduzido nas células do organismo receptor *in situ*, isto é, dentro do receptor. A terapia genética *in vivo* foi examinada em modelos animais. A praticabilidade da transferência genética direta *in situ* em órgãos e em tecidos tais como músculos, células-tronco hematopoiéticas, parede arterial, sistema nervoso e pulmão foi relatada. A injeção direta de DNA no músculo esquelético, no músculo cardíaco e a injeção de complexos de DNA-lipídeo na vasculatura também foi relatada como rendendo um nível detectável de expressão do(s) produto(s) do gene introduzido(s) *in vivo*.

[0006] O tratamento das doenças do sistema nervoso central (SNC), por exemplo, das doenças genéticas cerebrais tais como o mal de Alzheimer, permanece um problema intratável. Um problema principal ao tratar das doenças cerebrais é que as proteínas terapêuticas, quando aplicadas intravenosamente, não cruzam a barreira hematoencefálica ou, quando aplicadas diretamente ao cérebro, não são extensamente distribuídas. Desse modo, as terapias para tratamento do mal de Alzheimer precisam ser desenvolvidas.

SUMÁRIO

[0007] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método de tratamento do mal de Alzheimer em um mamífero, o qual compreende a administração ao fluido cerebroespinal (CSF) do mamífero de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende um ácido nucleico que

codifica uma isoforma ApoE de proteção da proteína inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV de uma maneira eficaz para infectar uma célula ependimal no mamífero não roedor, em que a célula ependimal secreta a ApoE para o tratamento da doença. Tal como utilizado na presente invenção, o termo "isoforma de ApoE de proteção" é utilizado para distinguir as isoformas de ApoE que diminuem o risco do mal de Alzheimer em pelo menos 5%, tal como 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ou mais.

[0008] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método de aplicação de uma isoforma de ApoE de proteção ao sistema nervoso central de um mamífero não roedor, o qual compreende a administração ao fluido cerebroespinal (CSF) do mamífero não roedor de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica a isoforma ApoE de proteção inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV de uma maneira eficaz para infectar as células ependimais no mamífero não roedor de tal modo que as células ependimais secretem a ApoE no CSF do mamífero. Em determinadas modalidades, a partícula de rAAV é uma partícula de rAAV2 que infecta a célula ependimal do não roedor a uma taxa 20% maior do que a taxa de infectividade de AAV4, como a uma taxa 50% ou 100%, 1000% ou 2000% maior do que a taxa de infectividade de AAV4.

[0009] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método para o tratamento de uma doença em um mamífero não roedor, o qual compreende a administração às células ependimais do mamífero de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE de proteção da proteína inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo

o ácido nucleico à célula ependimal, em que a célula ependimal secreta a proteína de ApoE para o tratamento da doença. A presente invenção provê um método de aplicação de um ácido nucleico a uma célula ependimal em um mamífero, o qual compreende a administração ao mamífero de uma partícula de AAV que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o ácido nucleico em uma célula ependimal no mamífero.

[0010] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê o método de aplicação de um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE de proteção a uma célula ependimal de um mamífero, o qual compreende a administração à célula ependimal de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o ácido nucleico à célula ependimal.

[0011] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método de aplicação de um ácido nucleico que codifica uma isoforma de ApoE de proteção a um mamífero, o qual compreende a administração a uma célula ependimal do mamífero de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV e retorno da célula ependimal ao mamífero, aplicando desse modo o ácido nucleico ao mamífero.

[0012] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método de aplicação de um ácido nucleico que codifica uma isoforma de ApoE de proteção a uma célula ependimal em um mamífero, o qual compreende a administração ao mamífero de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par

de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o ácido nucleico a uma célula ependimal no mamífero.

[0013] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um método para transfectar uma célula ependimal a um cérebro de mamífero, o qual compreende a administração ao fluido cerebroespinal (CSF) do mamífero de uma partícula de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo de AAV e um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE de proteção inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV de uma maneira eficaz para infectar as células ependimais no mamífero, de tal modo que as células ependimais secretem o agente no CSF do mamífero.

[0014] Em determinadas modalidades, o mamífero é um mamífero não roedor. Em determinadas modalidades, o mamífero não roedor é um primata, um cavalo, um carneiro, uma cabra, um porco ou um cão. Em determinadas modalidades, o primata é um ser humano.

[0015] Em determinadas modalidades, a isoforma ApoE de proteção tem homologia de pelo menos cerca de 80% a ApoE ε2. Em determinadas modalidades, a isoforma ApoE de proteção tem 100% de homologia a ApoE ε2.

[0016] Em determinadas modalidades, a partícula de AAV é uma partícula de rAAV4. Em determinadas modalidades, a partícula de AAV é uma partícula de rAAV2. Em determinadas modalidades, o capsídeo rAAV2 tem pelo menos 80% de homologia à proteína VP1, VP2 e/ou VP3 de capsídeo AAV2. Em determinadas modalidades, o capsídeo rAAV2 tem 100% de homologia a AAV2 ao capsídeo VP1, VP2 e/ou VP3.

[0017] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê uma partícula de rAAV que contém um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE de proteção inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV para o uso na

transfecção de células ependimais em um mamífero para gerar um resultado terapêutico.

[0018] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê o uso de uma partícula de rAAV que contém um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE de proteção inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV para a manufatura de um medicamento útil para o tratamento ou a prevenção do mal de Alzheimer em um animal, tal como um ser humano.

[0019] A presente invenção provê uma célula tal como descrito acima para o uso no tratamento médico ou no diagnóstico.

[0020] A presente invenção provê o uso da célula tal como descrito acima para preparar um medicamento útil para o tratamento do mal de Alzheimer em um mamífero.

[0021] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um kit que compreende um composto da partícula de rAAV que contém um vetor que compreende um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE de proteção inserida entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, um recipiente e uma inserção ou etiqueta de embalagem que indica a administração da partícula de AAV ao CSF para tratamento do mal de Alzheimer em um animal.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0022] **Figuras 1A-1B.** Injeção intraventricular de AAV4-ApoE conduz a uma expressão estável de huAPOE e a uma detecção sustentada da proteína de huApoE recombinante no cérebro.

[0023] **Figura 2.** Superexpressão de cada isoforma ApoE afeta diferencialmente a progressão da amiloidose.

[0024] **Figura 3.** Os tamanhos das chapas amiloïdes variam de acordo com cada isoforma ApoE.

[0025] **Figuras 4A-4B.** A avaliação pós-morte da carga amiloide confirma os efeitos de ApoE2 e de ApoE4 na deposição amiloide.

[0026] **Figuras 5A-5D.** Cada isoforma ApoE afeta diferencialmente a densidade sináptica em torno dos depósitos amiloides.

[0027] **A Figura 6A** é um alinhamento das proteínas AAV2 (SEQ ID N°.:1) e AAV4 (SEQ ID N°.:2) e a **Figura 6B** é um alinhamento dos nucleotídeos AAV2 (SEQ ID N°.:3) e AAV4 (SEQ ID N°.:4) com base na sequência de AAV2 (NC_001401) e AAV4 (NC_001829).

[0028] **A Figura 7** mostra uma atividade de TPP1 elevada em várias regiões do cérebro.

[0029] **A Figura 8** mostra os resultados do desempenho de T-maze do controle e dos cães tratados. Os círculos claros são para cães afetados; os quadrados escuros são para cães normais e os círculos escuros são para um TPP -/- cães tratados com AAV2-CLN2.

[0030] **Figuras 9A-9B. Figuras 9A-9B. Validação da abordagem de transferência genética de APOE pela injeção intraventricular de um serótipo 4 de AAV.** A etiquetação imuno-histológica de GFP ou de ApoE revelou a presença de GFP ou da proteína de ApoE humana no epêndima e no plexo coroide. (A) Uso de um ensaio ELISA específico de espécie para quantificar as concentrações da proteína de ApoE humana recombinante dentro dos homogenatos cerebrais de camundongos injetados. (B) Avaliação da porcentagem da proteína de ApoE humana comparada com o apoE endógeno por camundongo. A relação entre a ApoE humana e a apoE endógena de murino foi calculada para cada animal. Utilizando o anticorpo de ApoE anti-humano específico 3H1, a presença da proteína recombinante pode ser detectada em torno de alguns depósitos amiloides onde esta tende a se acumular, dentro do parênquima cortical de camundongos injetados com APP/PS1. Detecção de ApoE por transferência Western na amostra de ISF dos camundongos de KO de *apoE* injetados com um vetor de AAV4-APOE4. O anticorpo anti-apoE de cabra altamente sensível (mas não específico de espécie) da Millipore (AB947) foi

utilizado como um anticorpo de detecção. A albumina foi utilizada como um controle. n = 4-6 animais por grupo. *p < 0,05.

[0031] **Figuras 10A-10D. Os níveis de peptídeos A β e a densidade de depósitos amiloides são modulados pela superexpressão de alelos diferentes de APOE.** (A) Análise da densidade de depósitos amiloides no córtex (painel esquerdo) e no hipocampo (painel direito) de camundongos transgênicos injetados. Uma tendência similar poderia ser observada entre ambas as áreas cerebrais, mas os dados atingiram somente significância estatística no córtex. (B) Determinação por ELISA das concentrações de A β ₄₀ e A β ₄₂ peptídeos na fração de ácido fórmico (FA). (C) Quantificação por ELISA dos níveis de A β ₄₀ e A β ₄₂ peptídeos na fração solúvel de TBS 5 meses após a injeção intraventricular de cada AAV. (D) Quantificação dos níveis do plasma de A β ₄₀ peptídeos, 5 meses após a injeção intraventricular dos camundongos APP/PS1 com AAV-GFP e vetores AAV-APOE2/3/4. n = 4-7 animais por grupo. *p < 0,05.

[0032] **Figuras 11A-11B. Superexpressão de cada variante de APOE modula diferencialmente a progressão da amiloidose *in vivo*.** Imagens de dois fôtons *in vivo* foram reveladas da deposição amiloide nos camundongos APP/PS1 uma semana (T0), um mês (T1) e dois meses (T2) após a injeção intracerebroventricular com AAV-GFP, -3 ou -4 vetores de APOE2. Uma injeção intravenosa de Texas red dextran (70.000 Da) foi executada antes da geração da imagem, de modo que os mesmos campos de visão pudessem ser seguidos com o tempo. Dentro de um período de tempo de dois meses, poucas novas chapas amiloides puderam ser detectadas, ao passo que os depósitos ocasionais inicialmente visíveis não eram mais detectáveis após um ou dois meses. (A) Avaliação da densidade cortical volumétrica de depósitos amiloides durante um período de tempo de dois meses após a injeção intraventricular de um AAV-GFP, -APOE2, -

APOE3 ou -APOE4 em camundongos APP/PS1 com sete meses de idade. Foram tiradas imagens de seis a oito campos de visão longitudinalmente para cada animal, e a densidade das chapas foi calculada por volume do córtex e relatada ao valor inicial para cada animal na linha de base (T0). Uma progressão total de 0,23 da densidade de depósitos amiloides foi observada com o tempo (T2/T1, $p < 0,011$). Além disso, ApoE2 reduz de maneira significativa a densidade relativa a GFP em 0,66 ($se = 0,21$, $p = 0,002$), relativa a ApoE3 em 0,67 ($se = 0,17$, $p < 0,0001$) e em relação a ApoE4 em 0,74 ($se = 0,17$, $p < 0,0001$). (B) Ajuste de regressão linear da progressão da amiloidose acima de dois meses depois que a transferência genética nos camundongos APP/PS1 mostra que somente AAV-APOE4 induz a uma inclinação positiva significativa durante este período de tempo. $n = 4-6$ animais por grupo. * $p < 0,05$.

[0033] **Figura 12.** A evolução do tamanho dos depósitos amiloides um e dois meses após a infusão com ApoE2, -3 e -4. Gráfico dos pontos de dispersão de ApoE2, que representam a relação de tamanhos da chapa entre T1 e T0 mostrou que ApoE4 foi associado com o crescimento aumentado da chapa em comparação a ApoE2 e ApoE3 após um mês. Este efeito não é sustentado após 2 meses. $n > 50$ chapas medidas por grupo dentro de 3 a 4 animais, * $p < 0,05$.

[0034] **Figuras 13A-13C.** As mudanças neuropatológicas associadas com os depósitos amiloides são diferencialmente afetadas por cada variante de APOE. As imagens de seções da tomografia de arranjo imunotintidas para PSD95 (elemento pós-sináptico) e os depósitos amiloides nos camundongos APP/PS1 2 meses após a injeção intraventricular de AAV-GFP, -APOE2, -APOE3 e -APOE4 foram preparados. Os depósitos amiloides foram etiquetados utilizando o anticorpo NAB61 que demonstrou previamente etiquetar de preferência as espécies A β oligoméricas. (A) Uma perda significativamente mais

elevada do marcador de sinapsina-1 foi observada na vizinhança das chapas amiloides quando APOE3 e APOE4 foram expressos em comparação com GFP ou APOE2. (B) Um efeito similar foi observado quando os elementos pós-sinápticos foram quantificados, de modo que a densidade de PSD95 que cerca os depósitos foi diminuída 2 meses após uma injeção intraventricular de AAV4-APOE4. Como um parâmetro adicional de mudança neuropatológica, o número de distrofias neuríticas por chapa amiloide foi avaliado no cérebro dos camundongos injetados com APP/PS1, após imunotintimento para ThioS e o marcador axonal de SMI312. (C) Um deslocamento significativo para um número mais elevado de distrofias foi observado quando os camundongos infundidos com ApoE4 foram expressos em comparação aos grupos ApoE3 e ApoE2, sugerindo desse modo que a ApoE4 pode ter efeitos deletérios além da formação das chapas amiloides e pode modular o potencial neurotóxico de agregados amiloides oligoméricos menores. n=4-6 animais por grupo. *p < 0,05.

[0035] **Figura 14. As mudanças iniciais no teor das espécies oligoméricas A β são observadas no ISF após a injeção intracerebroventricular de AAV4-APOE2, -3, -4 nos camundongos Tg2576.** Quantificação do teor de ISF no oA β utilizando o ensaio ELISA 82E1/82E1 mostra que há uma concentração mais elevada da espécie β amiloide oligomérica após a injeção de AAV4-APOE4 em comparação ao AAV4-APOE2 e -GFP, ao passo que os camundongos injetados com AAV4-APOE3 atingiram um nível intermediário. n = 3-6 animais por grupo. *p < 0,05.

[0036] **Figuras 15A-15B. Detecção do mRNA de APOE de murino endógeno e humano e da proteína após a injeção intraventricular de um AAV4 nos camundongos APP/PS1.** (A) Gráficos da transferência Box que representam as quantidades de proteína de ApoE de murino endógeno nos cérebros de camundongos

injetados. (B) Comparação dos níveis da proteína de ApoE 2 e 5 meses apos a injeção intracerebroventricular de AAV4 nos camundongos APP/PS1 (as amostras de todos os camundongos injetados com ApoE foram agrupadas em 2 e 5 meses, sem discriminação para ao variante de APOE). n = 4-6 animais por grupo. *p < 0,05.

[0037] **Figuras 16A-16B. Efeitos em A β são associados com cada isoforma de ApoE após uma exposição curta (de 2 meses).** As imagens da deposição amiloide foram preparadas nos camundongos APP/PS1 2 meses após a injeção. O imunottingimento utilizando o anticorpo Bam10 e ThioS foi utilizado para tingir todos os depósitos amiloides ou as chapas de núcleo denso, respectivamente. (A) A análise estereológica da densidade de depósitos amiloides no córtex revelou que a superexpressão de APOE4 conduziu a um número aumentado de chapas tanto quanto 2 meses após a injeção, ao passo que nenhuma diferença pôde ser observada entre os outros grupos experimentais. (B) A relação entre o tingimento com Bam10 e ThioS, por outro lado, permanece inalterada entre todos os grupos diferentes. (C) Determinação das concentrações dos peptídeos A β_{40} (painéis à esquerda) e A β_{42} (painéis à direita) nos extratos de ácido fórmico insolúvel após uma exposição curta com variantes diferentes de ApoE. n = 3-5 animais por grupo. *p < 0,05.

[0038] **Figuras 17A-17B. Mudanças nas espécies A β solúveis e insolúveis detectadas 3 meses após a injeção nos camundongos Tg2576.** (A) Quantificação por ELISA do teor de ISF em A β_{40} e A β_{42} (B) mostra que há uma tendência a uma concentração mais elevada dos peptídeos β amiloides solúveis após a injeção de AAV4-APOE4 em comparação ao AAV4-APOE2, -APOE3 e -GFP. (B) Como previamente observado nos camundongos APP/PS1, o efeito mais forte foi visto com ApoE4, o que causa quantidades significativamente mais elevadas de A β_{42} na fração de ácido fórmico dos camundongos Tg2576. n = 3-5

animais por grupo. * $p < 0,05$.

DESCRÍÇÃO DETALHADA

[0039] Há várias isoformas humanas diferentes da apolipoproteína E (ApoE), e a presença de algumas destas isoformas no cérebro aumenta o risco para o mal de Alzheimer (MA), ao passo que a presença de outras isoformas diminui o risco para o MA. A presença da isoforma de ApoE ε4 é um fator de risco genético forte para o início do MA tardio e esporádico. (Casellano *et al.*, *Sci Transl Med*, 3(89):89ra57 (29 de junho de 2011).) O alelo de ApoE ε4 aumenta fortemente o risco do MA e diminui a idade de início. Por outro lado, a presença do alelo de ApoE ε2 parece diminuir o risco do MA. Sugere-se que as isoformas humanas de ApoE afetem diferencialmente a depuração ou a síntese do amiloide-β (Aβ) *in vivo*.

[0040] O vírus adenoassociado (AAV) é um vírus não patogênico pequeno da família Parvoviridae. O AAV é distinto dos outros membros desta família por sua dependência sobre um vírus auxiliar para a replicação. Na ausência de um vírus auxiliar, o AAV pode integrar de uma maneira específica de lócus no braço q do cromossomo 19. O genoma de cerca de 5 kb de AAV consiste em um segmento de DNA de cordão simples mais ou menos a polaridade. As extremidades do genoma são repetições de terminal invertido curtas que podem se dobrar em estruturas do tipo grampo de cabelo e servem como a origem da replicação do DNA viral. Fisicamente, o vírion de Parvovírus é não envelopado e seu capsídeo icosoedral tem cerca de 20 nm de diâmetro.

[0041] Até agora, oito AAVs sorologicamente distintos foram identificados e cinco foram isolados dos seres humanos ou dos primatas e são denominados como AAV tipos 1-5. Govindasamy *et al.*, "Structurally Mapping the Diverse Phenotype of Adeno-Associated Virus Serotype 4", *J. Vir.*, 80 (23):11556-11570 (2006). O genoma de

AAV2 tem 4.680 nucleotídeos de comprimento e contém dois quadros de leitura abertos (ORFs). O ORF esquerdo codifica as proteínas Rep não estruturais, Rep 40, Rep 52, Rep 68 e Rep 78, que estão envolvidas na regulação da replicação e da transcrição além da produção de genomas da progênie de cordão simples. Além disso, duas das proteínas Rep foram associadas com a integração preferencial dos genomas de AAV em uma região do braço q do cromossomo humano 19. Tb foi mostrado que Rep68/78 apresenta atividade de ligação de NTP bem como atividades de helicase de DNA e RNA. As proteínas Rep têm um sinal de localização nuclear bem como diversos sítios de fosforilação potenciais. A mutação de um destes sítios de quinase resultou em uma perda da atividade de replicação.

[0042] As extremidades do genoma são repetições de terminal invertido curtas (ITR) que têm o potencial de se dobrar nas estruturas do tipo grampo de cabelo em formato de T que servem como a origem da replicação do DNA viral. Dentro da região de ITR, dois elementos foram descritos, os quais são essenciais à função da ITR, de um motivo de repetição de GAGC e do sítio de resolução de terminal (trs). Foi mostrado que o motivo de repetição se liga a Rep quando a ITR está em uma conformação linear ou do tipo grampo de cabelo. Esta ligação serve para posicionar Rep68/78 para a clivagem no trs que ocorre de uma maneira específica de sítio e de cordão. Além de seu papel na replicação, estes dois elementos parecem ser essenciais à integração viral. Dentro do lócus da integração do cromossomo 19 está contido um sítio de ligação Rep com trs adjacentes. Foi mostrado que estes elementos são funcionais e necessários à integração específica de lócus.

[0043] O vírion AAV2 é uma partícula não envelopada, icosoedral de cerca de 25 nm de diâmetro, consistindo em três proteínas relacionadas denominadas como VP1, VP2 e VP3. O ORF direito

codifica as proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3. Estas proteínas são encontradas em uma relação de 1:1:10, respectivamente, e são todas derivadas do ORF direito. As proteínas de capsídeo diferem entre si pelo uso de emenda alternativa e de um códon inicial incomum. A análise de eliminação mostrou que a remoção ou alteração de VP1 que é traduzida de uma mensagem alternativamente emendada resulta em um rendimento reduzido de partículas de infecções. As mutações dentro da região de codificação de VP3 resultam na falha em produzir qualquer DNA de progênie de cordão simples ou de partícula infecciosa. Uma partícula AAV2 é uma partícula viral que compreende uma proteína de capsídeo AAV2. Um polipeptídeo de capsídeo AAV2 pode codificar o polipeptídeo VP1, VP2 e VP3 inteiro. A partícula pode ser uma partícula que compreende AAV2 e outras proteínas de capsídeo de AAV (isto é, uma proteína quimérica, tal como AAV4 e AAV2). As variações na sequência de aminoácidos da proteína de capsídeo AAV2 são aqui contempladas, contanto que a partícula viral resultante compreenda o capsídeo AAV2 que permanece antigênica ou imunologicamente distinto de AAV4, como pode ser rotineiramente determinado pelos métodos padrão. Especificamente, por exemplo, ELISA e as transferências Western podem ser utilizadas para determinar se uma partícula viral é antigênica ou imunologicamente distinta de AAV4. Além disso, a partícula AAV2 viral retém de preferência o tropismo de tecido distinto de AAV4.

[0044] Uma partícula AAV2 é uma partícula viral que compreende uma proteína de capsídeo AAV2. Um polipeptídeo de capsídeo AAV2 que codifica o polipeptídeo VP1, VP2 e VP3 inteiro tem homologia (ou identidade) de pelo menos cerca de 63% ao polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos codificada pelos nucleotídeos determinados na SEQ ID Nº.:1 (proteína de capsídeo AAV2). A proteína de capsídeo pode ter cerca de 70% de homologia, cerca de 75% de homologia,

80% de homologia, 85% de homologia, 90% de homologia, 95% de homologia, 98% de homologia, 99% de homologia ou ainda 100% de homologia à proteína determinada na SEQ ID N°.:1. A proteína de capsídeo pode ter cerca de 70% de identidade, cerca de 75% de identidade, 80% de identidade, 85% de identidade, 90% de identidade, 95% de identidade, 98% de identidade, 99% de identidade ou ainda 100% de identidade à proteína determinada na SEQ ID N°.:1. A partícula pode ser uma partícula que compreende a proteína de capsídeo AAV4 e AAV2, isto é, uma proteína quimérica. As variações na sequência de aminoácidos da proteína de capsídeo AAV2 são contempladas na presente invenção, contanto que a partícula viral resultante que compreende o capsídeo AAV2 permaneça antigênica ou imunologicamente distinta de AAV4, como pode ser rotineiramente determinado pelos métodos padrão. Especificamente, por exemplo, ELISA e as transferências Western podem ser utilizadas para determinar se uma partícula viral é antigênica ou imunologicamente distinta de AAV4. Além disso, a partícula AAV2 viral retém de preferência a distinção de tropismo de tecido de AAV4, tal como aquela exemplificada nos exemplos da presente invenção, embora uma partícula AAV2 quimérica que compreende pelo menos uma proteína de revestimento AAV2 possa ter um tropismo de tecido diferente daquele de uma partícula AAV2 que consiste somente nas proteínas de revestimento AAV2.

[0045] Tal como indicado nas **Figuras 6A e 6B**, a sequência de capsídeo AAV2 e a sequência de capsídeo AAV4 são cerca de 60% homólogas. Em determinadas modalidades, o capsídeo AAV2 compreende (ou consiste em) uma sequência que é pelo menos 65% homóloga à sequência de aminoácidos determinada na SEQ ID N°.:1.

[0046] Em determinadas modalidades, a invenção provê adicionalmente uma partícula AAV2 que contém, isto é, encapsida, um

vetor que compreende um par de repetições de terminal invertido AAV2. As ITRs da sequência de nucleotídeos de AAV2 são conhecidas no estado da técnica. Além disso, a partícula pode ser uma partícula que compreende a proteína de capsídeo AAV4 e AAV2, isto é, uma proteína quimérica. Além disso, a partícula pode ser uma partícula que encapsida um vetor que compreende um par de repetições de terminal invertido de AAV de outros AAVs (por exemplo, AAV1-AAV8). O vetor encapsulado na partícula pode adicionalmente compreender um ácido nucleico exógeno introduzido entre as repetições de terminal invertido.

[0047] As seguintes características de AAV tornaram o mesmo um vetor atrativo para a transferência genética. Foi mostrado que os vetores de AAV *in vitro* se integram estavelmente no genoma celular; têm uma larga faixa de hospedeiros; convertem as células que se dividem e as que não se dividem *in vitro* e *in vivo* e mantêm níveis elevados de expressão de genes transduzidos. As partículas virais são estáveis ao calor, resistentes a solventes, detergentes, mudanças no pH, temperatura e podem ser concentradas em gradientes de CsCl. A integração do provírus de AAV não é associada a nenhum efeito negativo em longo prazo no crescimento ou na diferenciação celular. Foi mostrado que as ITRs são os únicos elementos *cis* necessários para a replicação, o empacotamento e a integração, e podem conter algumas atividades do promotor.

[0048] A presente invenção provê métodos para administrar partículas de AAV, vetores recombinantes de AAV e vírions recombinantes de AAV. Por exemplo, uma partícula AAV2 é uma partícula viral que compreende uma proteína de capsídeo AAV2 ou uma partícula AAV4 é uma partícula viral que compreende uma proteína de capsídeo AAV4. Um vetor AAV2 recombinante é um construto de ácido nucleico que compreende pelo menos um ácido

nucleico original de AAV2. Um vírion AAV2 recombinante é uma partícula que contém um vetor AAV2 recombinante. Para ser considerado dentro do termo "ITRs de AAV2", a sequência de nucleotídeos deve reter uma ou ambas as características descritas na presente invenção, as quais distinguem a ITR de AAV2 da ITR de AAV4: (1) três (em vez de quatro, como em AAV4) repetições de "GAGC" e (2) no sítio de ligação Rep de ITR de AAV2, o quarto nucleotídeo nas duas primeiras repetições de "GAGC" é um C em vez de um T.

[0049] O promotor pode ser qualquer promotor desejado, selecionado pelas considerações conhecidas, tais como o nível de expressão de um ácido nucleico ligado funcionalmente ao promotor e o tipo de célula em que o vetor deve ser utilizado. Os promotores podem ser um promotor exógeno ou endógeno. Os promotores podem incluir, por exemplo, promotores fortes conhecidos, tais como SV40 ou o promotor de metalotioneína induzível ou um promotor de AAV, tal como um promotor de AAV p5. Os exemplos adicionais de promotores incluem os promotores derivados dos genes de actina, genes de imunoglobulina, citomegalovírus (CMV), adenovírus, papilomavírus bovino, promotores adenovirais, tais como o promotor tardio principal adenoviral, um promotor de choque térmico induzível, vírus sincicial respiratório, vírus do sarcoma de Rous (RSV), etc. Especificamente, o promotor pode ser o promotor de AAV2 p5 ou promotor de AAV4 p5. Além disso, fragmentos menores do promotor p5 que retêm atividade do promotor podem ser prontamente determinados por procedimentos padrão incluindo, por exemplo, a construção de uma série de eliminações no promotor p5, a ligação da eliminação a um gene relator e a determinação se o gene relator está expresso, isto é, transcrito e/ou traduzido.

[0050] O vetor de AAV pode adicionalmente compreender um

ácido nucleico (heterólogo) exógeno ligado funcionalmente ao promotor. Por "ácido nucleico heterólogo" entenda que o ácido nucleico heterólogo ou exógeno pode ser introduzido no vetor para transferência em uma célula, em um tecido ou em um organismo. Por exemplo, em determinadas modalidades, o ácido nucleico heterólogo codifica uma isoforma de ApoE de proteção. Por "ligado funcionalmente" entenda que o promotor pode promover a expressão do ácido nucleico heterólogo, como é conhecido no estado da técnica, tal como a orientação apropriada do promotor relativo ao ácido nucleico heterólogo. Além disso, o ácido nucleico heterólogo tem de preferência todas as sequências apropriadas para a expressão do ácido nucleico, como conhecido no estado da técnica, para codificar funcionalmente, isto é, permitir que o ácido nucleico seja expresso. O ácido nucleico pode incluir, por exemplo, sequências de controle de expressão, tais como um intensificador e os sítios de processamento de informações necessários, tais como os sítios de ligação de ribossomo, sítios de emenda de RNA, sítios de poliadenilação e sequências do terminador transcrecional. O ácido nucleico pode codificar mais de um produto do gene, limitado somente pelo tamanho do ácido nucleico que pode ser empacotado.

[0051] Uma partícula AAV2 é uma partícula viral que comprehende uma proteína de capsídeo AAV2. As variações na sequência de aminoácidos da proteína de capsídeo AAV2 são contempladas na presente invenção, contanto que a partícula viral resultante que comprehende o capsídeo AAV2 permaneça antigênica ou imunologicamente distinta de AAV4, como pode ser rotineiramente determinado pelos métodos padrão. Especificamente, por exemplo, ELISA e as transferências Western podem ser utilizados para determinar se uma partícula viral é antigênica ou imunologicamente distinta de outros serótipos de AAV.

[0052] AAV4 é um membro original da família de AAV. Uma discussão de AAV4 é provida na Patente U.S. Nº. 6.468.524, que é incorporada na presente invenção a título de referência. Os dados da hibridização do DNA indicaram um nível similar de homologia para AAV1-4. No entanto, em contraste aos outros AAVs, somente um ORF que corresponde às proteínas de capsídeo foi identificado em AAV4, e nenhum ORF foi detectado para as proteínas Rep. A presente invenção provê um vetor que comprehende o vírus AAV4 bem como as partículas virais AAV4. Embora o AAV4 seja similar a AAV2, foi verificado na presente invenção que os dois vírus são física e geneticamente distintos. Estas diferenças conferem ao AAV4 algumas vantagens exclusivas que mais bem se adaptam como um vetor para a terapia genética. Por exemplo, o genoma de AAV4 do tipo selvagem é maior do que AAV2, permitindo a encapsidação eficiente de um genoma recombinante maior. Além disso, as partículas de AAV4 do tipo selvagem têm uma densidade flutuante maior do que as partículas AAV2 e são, portanto, mais facilmente separadas do vírus auxiliar contaminante e das partículas vazias de AAV do que as partículas com base em AAV2. Além disso, em contraste a AAV1, 2 e 3, AAV4 pode hemaglutinar eritrócitos humanos, de porco, de porquinho-da-índia e de carneiro.

[0053] Em determinadas modalidades, a presente invenção provê um vetor que comprehende o vírus AAV5 ou um vetor que comprehende subpartes do vírus, bem como as partículas AAV5 virais. Uma discussão de AAV5 é provida na Patente U.S. Nº. 6.855.314, que é incorporada na presente invenção a título de referência. Embora AAV5 seja similar a AAV2, foi verificado na presente invenção que os dois vírus são física e geneticamente distintos. Estas diferenças conferem a AAV5 algumas propriedades e vantagens exclusivas que mais bem se adaptam como um vetor para a terapia genética. Por exemplo, uma das

características limitadoras do uso de AAV2 como um vetor para a terapia genética é a produção de grandes quantidades de vírus. Utilizando técnicas de produção padrão, o AAV5 é produzido a um nível de 10 a 50 vezes mais elevado do que comparado a AAV2. Por causa de seu sítio de TRS exclusivo e das proteínas Rep, o AAV5 também deve ter um lócus de integração distinto se comparado a AAV2.

[0054] Além disso, a proteína de capsídeo AAV5, nova e surpreendentemente, é distinta da proteína de capsídeo AAV2 e exibe um tropismo de tecido diferente, tornando desse modo as partículas AAV5 contendo o capsídeo apropriadas para a transdução de tipos de células para que AAV2 seja inadequado ou menos adequado. Foi mostrado que AAV2 e AAV5 são sorologicamente distintos e, desse modo, em uma aplicação de terapia genética, AAV5 e os vetores derivados de AAV5 permitiriam a transdução de um paciente que já tem anticorpos neutralizantes para AAV2 em consequência da defesa imune natural ou da exposição prévia aos vetores AAV2. Outra vantagem do AAV5 é que o AAV5 não pode ser resgatado por outros serótipos. Somente o AAV5 pode resgatar o genoma de AAV5 integrado e a replicação de efeito, evitando desse modo a replicação não intencional do AAV5 causada por outros serótipos de AAV.

[0055] O termo "polipeptídeo" tal como utilizado na presente invenção se refere a um polímero de aminoácidos e inclui proteínas e fragmentos de comprimento cheio deste. Desse modo, a "proteína", o "polipeptídeo" e o "peptídeo" são frequentemente utilizados permutavelmente na presente invenção. As substituições podem ser selecionadas pelos parâmetros conhecidos para ser neutras. Tal como será apreciado pelos elementos versados na técnica, a invenção também inclui aqueles polipeptídeos que têm variações ligeiras em sequências de aminoácidos ou outras propriedades. Tais variações podem surgir naturalmente como as variações alélicas (por exemplo, devido ao

polimorfismo genético) ou podem ser produzidas pela intervenção humana (por exemplo, pela mutagênese de sequências clonadas do DNA), como mutantes de ponto induzido, de eliminação, de inserção e de substituição. Mudanças menores em uma sequência de aminoácidos são geralmente preferidas, como substituições de aminoácidos conservadores, eliminações ou inserções internas pequenas e adições ou eliminações nas extremidades das moléculas. Estas modificações podem resultar em mudanças na sequência de aminoácidos, prover mutações silenciosas, modificar um sítio de restrição ou prover outras mutações específicas.

[0056] O presente método provê um método de aplicação de um ácido nucleico a uma célula, o qual compreende a administração à célula de uma partícula de AAV que contém um vetor que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o ácido nucleico à célula. A administração à célula pode ser realizada por qualquer dispositivo, incluindo simplesmente o contato com a partícula, contida opcionalmente em um líquido desejado tal como o meio de cultura de tecido ou uma solução salina tamponada, com as células. A partícula pode ser levada a permanecer em contato com as células por qualquer período de tempo desejado e, tipicamente, a partícula é administrada e levada a permanecer indefinidamente. Para tais métodos *in vitro*, o vírus pode ser administrado à célula pelos métodos virais de transdução padrão, como conhecido no estado da técnica e como exemplificado na presente invenção. Os títulos dos vírus a administrar podem variar, dependendo particularmente do tipo de célula, mas serão típicos daqueles utilizados para a transdução de AAV em geral. Além disso, os títulos utilizados para transduzir as células particulares nos presentes exemplos podem ser utilizados. As células podem incluir qualquer célula desejada nos seres humanos, bem como outros mamíferos

grandes (não roedores), tais como primata, cavalo, carneiro, cabra, porco e cão.

[0057] Mais especificamente, a presente invenção provê um método de aplicação de um ácido nucleico a uma célula ependimal, o qual compreende a administração à célula ependimal de uma partícula de AAV que contém um vetor que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o ácido nucleico à célula ependimal.

[0058] A presente invenção inclui também um método de aplicação de um ácido nucleico a um indivíduo, o qual compreende a administração a uma célula do indivíduo de uma partícula de AAV que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV e o retorno da célula ao indivíduo, aplicando desse modo o ácido nucleico ao indivíduo. Em determinadas modalidades, as ITRs do AAV podem ser ITRS de AAV2. Para tal administração *ex vivo*, as células são isoladas de um indivíduo pelos dispositivos padrão de acordo com o tipo de célula e colocadas no meio de cultura apropriado, outra vez de acordo com o tipo de célula. As partículas virais entram então em contato com as células como descrito acima e o vírus é levado a transfectar as células. As células podem então ser transplantadas novamente no corpo do indivíduo, outra vez pelos dispositivos padrão para o tipo de célula e tecido. Se desejado, antes do transplante, as células podem ser estudadas quanto ao grau de transfecção pelo vírus, pelos dispositivos conhecidos de detecção e tal como descrito na presente invenção.

[0059] A presente invenção provê adicionalmente um método de aplicação de um ácido nucleico a uma célula em um indivíduo, o qual compreende a administração ao indivíduo de uma partícula de AAV que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o

ácido nucleico a uma célula no indivíduo. A administração pode ser uma administração *ex vivo* diretamente a uma célula removida de um indivíduo, tal como qualquer uma das células relacionadas acima, seguido pela recolocação da célula novamente no indivíduo, ou a administração pode ser uma administração *in vivo* a uma célula no indivíduo. Para a administração *ex vivo*, as células são isoladas de um indivíduo pelos dispositivos padrão de acordo com o tipo de célula e colocadas no meio de cultura apropriado, outra vez de acordo com o tipo de célula. As partículas virais então entram em contato com as células como descrito acima e o vírus é levado a transfectar as células. As células podem então ser transplantadas novamente no corpo do indivíduo, outra vez pelos dispositivos padrão para o tipo de célula e tecido. Caso desejado, antes do transplante, as células podem ser estudadas quanto ao grau de transfecção pelo vírus, pelos meios conhecidos de detecção e como descrito na presente invenção.

[0060] Também é provido um método de aplicação de um ácido nucleico a uma célula ependimal em um indivíduo, o qual compreende a administração ao indivíduo de uma partícula de AAV que compreende o ácido nucleico introduzido entre um par de repetições de terminal invertido de AAV, aplicando desse modo o ácido nucleico a uma célula ependimal no indivíduo.

[0061] Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos que alveja o endotélio vascular cerebral alveja o endotélio vascular cerebral em um indivíduo que tem uma doença, por exemplo, mal de Alzheimer.

[0062] Em determinadas modalidades, a sequência de aminoácidos que alveja o endotélio vascular cerebral alveja o endotélio vascular cerebral em um indivíduo que não tem o mal de Alzheimer.

[0063] Em determinadas modalidades, o vetor viral compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica um agente terapêutico.

Em determinadas modalidades, o agente terapêutico é uma isoforma de ApoE de proteção.

[0064] Determinadas modalidades da presente invenção provêm uma célula que compreende um vetor viral como descrito na presente invenção.

[0065] Em determinadas modalidades, a célula é uma célula de mamífero de um mamífero não roedor. Em determinadas modalidades, a célula é uma célula de primata. Em determinadas modalidades, a célula é uma célula humana. Em determinadas modalidades, a célula é uma célula não humana. Em determinadas modalidades, a célula é *in vitro*. Em determinadas modalidades, a célula é *in vivo*. Em determinadas modalidades, a célula é uma célula ependimal.

[0066] Determinadas modalidades da presente invenção provêm um método para o tratamento de uma doença em um mamífero, que compreende a administração de um vetor viral ou da célula como descrito na presente invenção ao mamífero.

[0067] Em determinadas modalidades, o mamífero é humano.

[0068] Determinadas modalidades da presente invenção provêm um método para aplicar um agente ao sistema nervoso central de um indivíduo, que compreende a administração ao CSF com um vetor viral descrito na presente invenção de modo que as células ependimais transduzidas expressem o agente terapêutico e aplicam o agente ao sistema nervoso central do indivíduo. Em determinadas modalidades, o vetor viral transduz as células ependimais.

[0069] Determinadas modalidades da presente invenção provêm um vetor ou uma célula viral como descrito na presente invenção para o uso em tratamentos médicos.

[0070] Determinadas modalidades da presente invenção provêm o uso de um vetor viral ou de uma célula como descrito na presente invenção para preparar um medicamento útil para o tratamento de

uma doença, por exemplo, o mal de Alzheimer, em um mamífero.

[0071] O vetor pode adicionalmente compreender uma isoforma ApoE de proteção da proteína. Tal como utilizado na presente invenção, o termo "proteína secretada" inclui qualquer proteína secretada, quer seja secretada naturalmente ou modificada para conter uma sequência de sinal de modo que possa ser secretada.

[0072] O ácido nucleico está "ligado de modo operativo" quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. De modo geral, "ligado de modo operativo" significa que as sequências de DNA que estão sendo ligadas são contíguas. No entanto, os intensificadores não têm que ser contíguos. A ligação é realizada pela ligação em sítios de restrição convenientes. Se tais sítios não existirem, adaptadores ou ligandos sintéticos do oligonucleotídeo serão utilizados de acordo com a prática convencional. Além disso, múltiplas cópias de enzimas de codificação de ácido nucleico podem ser ligadas no vetor de expressão. Tais ácidos nucleicos múltiplos podem ser separados por ligandos.

[0073] A presente invenção também provê uma célula de mamífero que contém um vetor descrito na presente invenção. A célula pode ser humana e pode ser cerebral. O tipo de célula pode ser uma população de células-tronco ou progenitoras.

[0074] A presente invenção provê um método para o tratamento de uma doença tal como uma doença ou um câncer genético em um mamífero pela administração de um polinucleotídeo, um polipeptídeo, um vetor de expressão ou de uma célula aqui descrita. A doença genética pode ser uma doença neurodegenerativa, tal como o mal de Alzheimer.

[0075] Determinados aspectos da invenção referem-se aos polinucleotídeos, aos polipeptídeos, aos vetores e às células geneticamente projetadas (modificadas *in vivo*) e ao uso destes. Em particular,

a invenção se refere a um método para a terapia genética ou da proteína que pode aplicar sistematicamente uma dose terapeuticamente eficaz do agente terapêutico.

[0076] De acordo com um aspecto, é provido um sistema de expressão de células para expressar um agente terapêutico em um receptor mamífero. O sistema de expressão (também denominado na presente invenção como "célula geneticamente modificada") compreende uma célula e um vetor de expressão para expressar o agente terapêutico. Os vetores de expressão incluem, mas não são limitados a vírus, plasmídeos e outros veículos para aplicar o material genético heterólogo às células. Consequentemente, o termo "vetor de expressão" tal como utilizado na presente invenção se refere a um veículo para aplicar o material genético heterólogo a uma célula. Em particular, o vetor de expressão é um vírus recombinante ou um vetor adenoviral, vírus adenoassociado, lentivírus ou retrovírus.

[0077] O vetor de expressão inclui adicionalmente um promotor para controlar a transcrição do gene heterólogo. O promotor pode ser um promotor induzível (descrito a seguir). O sistema de expressão é apropriado para a administração ao receptor mamífero. O sistema de expressão pode compreender uma pluralidade de células geneticamente modificadas não imortalizadas, sendo que cada célula contém pelo menos um gene recombinante que codifica pelo menos um agente terapêutico.

[0078] O sistema de expressão da célula pode ser formado *in vivo*. Contudo, de acordo com outro aspecto, é provido um método para o tratamento de um receptor mamífero *in vivo*. O método inclui a introdução de um vetor de expressão para expressar um produto de gene heterólogo em uma célula do paciente *in situ*, como através da administração intravenosa. Para formar o sistema de expressão *in vivo*, um vetor de expressão para expressar o agente terapêutico é

introduzido *in vivo* no receptor mamífero i.v., onde o vetor migra através da vasculatura ao cérebro.

[0079] Contudo, de acordo com outro aspecto, é provido um método para o tratamento de um receptor mamífero *in vivo*. O método inclui a introdução da proteína alvo no paciente *in vivo*.

[0080] O vetor de expressão para expressar o gene heterólogo pode incluir um promotor induzível para controlar a transcrição do produto de gene heterólogo. Consequentemente, a aplicação do agente terapêutico *in situ* é controlada ao expor a célula *in situ* às condições que induzem a transcrição do gene heterólogo.

[0081] O receptor mamífero pode ter uma condição que seja favorável à terapia de reposição genética. Tal como utilizado na presente invenção, a "terapia de reposição genética" se refere à administração ao receptor do material genético exógeno que codifica um agente terapêutico e uma expressão subsequente do material genético administrado *in situ*. Desse modo, o termo "condição favorável à terapia de reposição genética" abrange condições tais como as doenças genéticas (isto é, uma condição de doença que é atribuível a um ou mais defeitos genéticos), patologias adquiridas (isto é, uma condição patológica que não é atribuível a um defeito congênito), cânceres e processos profiláticos (isto é, prevenção de uma doença ou de uma condição médica indesejada). Consequentemente, tal como utilizado na presente invenção, o termo "agente terapêutico" se refere a qualquer agente ou material, que tenha um efeito benéfico sobre o receptor mamífero. Desse modo, o "agente terapêutico" abrange as moléculas terapêuticas e profiláticas que têm componentes de ácido nucleico ou de proteína.

[0082] De acordo com uma modalidade, o receptor mamífero tem uma doença genética, e o material genético exógeno compreende um gene heterólogo que codifica um agente terapêutico para o tratamento

de a doença. Contudo, em outra modalidade, o receptor mamífero tem uma patologia adquirida, e o material genético exógeno compreende um gene heterólogo que codifica um agente terapêutico para o tratamento de a patologia. De acordo com outra modalidade, o paciente tem um câncer, e o material genético exógeno compreende um gene heterólogo que codifica um agente antineoplásico. Contudo, em outra modalidade, o paciente tem uma condição médica indesejada, e o material genético exógeno compreende um gene heterólogo que codifica um agente terapêutico para o tratamento de a condição.

[0083] Tal como utilizado na presente invenção, o termo "uma isoforma de ApoE de proteção" inclui variantes ou fragmentos biologicamente ativos ou inativos deste polipeptídeo. Uma "variante" de um dos polipeptídeos é um polipeptídeo que não é completamente idêntico a uma proteína nativa. Tal proteína variante pode ser obtida ao alterar a sequência de aminoácidos por meio de inserção, eliminação ou substituição de um ou mais aminoácidos. A sequência de aminoácidos da proteína é modificada, por exemplo, por substituição, para criar um polipeptídeo que tem substancialmente qualidades iguais ou incrementadas em comparação ao polipeptídeo nativo. A substituição pode ser uma substituição conservada. Uma "substituição conservada" é uma substituição de um aminoácido com outro aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Uma substituição conservada seria uma substituição por um aminoácido que faz a menor mudança possível na carga do aminoácido ou no tamanho da cadeia lateral do aminoácido (alternativamente, no tamanho, na carga ou no tipo de grupo químico dentro da cadeia lateral), de tal modo que o peptídeo total retém sua conformação espacial, mas atividade biológica alterada. Por exemplo, as mudanças conservadas comuns podem ser Asp a Glu, Asn ou Gln; His a Lys, Arg ou Phe; Asn a Gln, Asp ou Glu e Ser a Cys, Thr ou Gly. A alanina é geralmente utilizada

para substituir por outros aminoácidos. Os 20 aminoácidos essenciais podem ser agrupados como segue: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina, que têm cadeias laterais não polares; glicina, serina, treonina, cistina, tirosina, asparagina e glutamina, que têm cadeias laterais polares não carregadas; aspartato e glutamato, que têm cadeias laterais ácidas; e lisina, arginina e histidina, que têm cadeias laterais básicas.

[0084] As mudanças de aminoácidos são obtidas ao alterar os códons da sequência correspondente de ácido nucleico. É sabido que tais polipeptídeos podem ser obtidos com base na substituição de certos aminoácidos por outros aminoácidos na estrutura do polipeptídeo, a fim de modificar ou incrementar a atividade biológica. Por exemplo, através da substituição de aminoácidos alternativos, pequenas mudanças conformacionais podem ser obtidas em um polipeptídeo que resulta em atividade aumentada. Alternativamente, substituições de aminoácidos em determinados polipeptídeos podem ser utilizadas para prover resíduos, que podem ser então ligados a outras moléculas para prover conjugados de peptídeo-molécula que retêm propriedades suficientes do polipeptídeo inicial para ser úteis para outras finalidades.

[0085] Pode-se utilizar o teor hidropático de aminoácidos para conferir uma função biológica interativa em um polipeptídeo, sendo que foi verificado que determinados aminoácidos podem ser substituídos por outros aminoácidos que têm teores hidropáticos similares e ainda retêm uma atividade biológica similar. Alternativamente, a substituição de aminoácidos semelhantes pode ser feita com base na capacidade hidrofílica, em particular onde a função biológica desejada no polipeptídeo a ser gerado se destina ao uso em modalidades imunológicas. A maior capacidade hidrofílica média local de uma "proteína", como regulado pela capacidade hidrofílica de seus

aminoácidos adjacentes, correlaciona-se com sua imunogenicidade. Consequentemente, observa-se que as substituições podem ser feitas com base na capacidade hidrofílica atribuída a cada um dos aminoácidos.

[0086] Ao utilizar o teor de capacidade hidrofílica ou o teor hidropático, o qual atribui valores a cada aminoácido, prefere-se conduzir substituições de aminoácidos onde estes valores são ± 2 , com ± 1 sendo particularmente preferido, e em que aquelas com $\pm 0,5$ representam as substituições preferidas.

[0087] A proteína variante tem pelo menos 50%, pelo menos cerca de 80% ou ainda pelo menos cerca de 90% mas menos de 100% de homologia à sequência de aminoácidos contíguos ou identidade à sequência de aminoácidos de uma proteína nativa correspondente.

[0088] A sequência de aminoácidos do polipeptídeo variante corresponde essencialmente à sequência de aminoácidos do polipeptídeo nativo. Tal como utilizado na presente invenção "que corresponde essencialmente" se refere a uma sequência de polipeptídeo que provoca uma resposta biológica substancialmente igual à resposta gerada pela proteína nativa. Tal resposta pode ser pelo menos 60% do nível gerado pela proteína nativa e pode ainda ser pelo menos 80% do nível gerado pela proteína nativa.

[0089] Uma variante pode incluir resíduos de aminoácidos não presentes na proteína nativa correspondente ou nas eliminações em relação à proteína nativa correspondente. Uma variante também pode ser um "fragmento truncado" em comparação à proteína nativa correspondente, isto é, somente uma porção de uma proteína de comprimento cheio. As variantes da proteína também incluem os peptídeos que têm pelo menos um D-aminoácido.

[0090] A proteína variante pode ser expressa a partir de uma sequência de DNA isolada que codifica a proteína variante.

"Recombinante" é definido como um peptídeo ou um ácido nucleico produzido pelos processos de engenharia genética. Deve-se observar que é bem conhecido na técnica que, devido à redundância no código genético, os nucleotídeos individuais podem ser prontamente trocados em um códon e ainda resultar em uma sequência de aminoácidos idêntica. Os termos "proteína," "peptídeo" e "polipeptídeo" são utilizados permutavelmente na presente invenção.

[0091] A presente invenção provê métodos para o tratamento de uma doença em um mamífero ao administrar um vetor de expressão a uma célula ou a um paciente. Para os métodos de terapia genética, um elemento versado na técnica de terapia genética e de biologia molecular poderia determinar, sem experimentação imprópria, as dosagens e vias de administração apropriadas do vetor de expressão utilizado nos novos métodos da presente invenção.

[0092] De acordo com uma modalidade, as células são transformadas ou então geneticamente modificadas *in vivo*. As células do receptor mamífero são transformadas (isto é, transduzidas ou transfec-tadas) *in vivo* com um vetor que contém o material genético exógeno para expressar um gene heterólogo (por exemplo, recombinante) que codifica um agente terapêutico, e o agente terapêutico é aplicado *in situ*.

[0093] Tal como utilizado na presente invenção, o "material genético exógeno" se refere a um ácido nucleico ou a um oligonucleotídeo, natural ou sintético, que não é encontrado naturalmente nas células; ou caso se encontre naturalmente nas células, não é transcrito nem expresso em níveis biologicamente significativos pelas células. Desse modo, o "material genético exógeno" inclui, por exemplo, um ácido nucleico que não ocorre naturalmente que pode ser transcrito no RNA antissenso, bem como um "gene heterólogo" (isto é, um gene que codifica uma proteína que não é expressa ou é expressa em níveis biologicamente insignificantes em uma célula natural do mesmo tipo).

[0094] Nas modalidades em questão, o receptor mamífero tem uma condição que é favorável à terapia de reposição genética. Tal como utilizado na presente invenção, a "terapia de reposição genética" se refere à administração ao receptor do material genético exógeno que codifica um agente terapêutico e a expressão subsequente do material genético administrado *in situ*. Desse modo, o termo "condição favorável à terapia de reposição genética" abrange condições tais como doenças genéticas (isto é, uma condição de doença que é atribuível a um ou mais defeitos genéticos), patologias adquiridas (isto é, uma condição patológica que não é atribuível a um defeito congênito), cânceres e processos profiláticos (isto é, prevenção de uma doença ou de uma condição médica indesejada). Consequentemente, tal como utilizado na presente invenção, o termo "agente terapêutico" se refere a qualquer agente ou material que tem um efeito benéfico no receptor mamífero. Desse modo, o "agente terapêutico" abrange as moléculas terapêuticas e profiláticas que têm os componentes do ácido nucleico (por exemplo, RNA antissenso) e/ou da proteína.

[0095] Alternativamente, a condição favorável à terapia de reposição genética é um processo profilático, isto é, um processo para impedir a doença ou uma condição médica indesejada. Desse modo, a presente invenção abrange um sistema de expressão da célula para aplicar um agente terapêutico que tem uma função profilática (isto é, um agente profilático) ao receptor mamífero.

[0096] Em suma, o termo "agente terapêutico" inclui, mas sem ficar a eles limitado, os agentes associados com as condições relacionadas acima, bem como seus equivalentes funcionais. Tal como utilizado na presente invenção, o termo "equivalente funcional" se refere a uma molécula (por exemplo, um peptídeo ou proteína) que tem o mesmo efeito ou um efeito benéfico incrementado sobre o

receptor mamífero de cujo agente terapêutico se considera um equivalente funcional.

[0097] Os agentes terapêuticos e as condições acima descritas favoráveis à terapia de reposição genética são meramente ilustrativos e não se prestam a limitar o âmbito da presente invenção. Considerase que a seleção de um agente terapêutico apropriado para o tratamento de uma condição conhecida esteja dentro do âmbito do elemento versado na técnica, sem experimentação imprópria.

Vetores de AAV

[0098] Em uma modalidade, um vetor viral da descrição é um vetor de AAV. Um vetor de "AAV" se refere a um vírus adenoassociado e pode ser utilizado para se referir ao próprio vírus do tipo selvagem natural ou derivados deste. O termo abrange todos os subtipos, serótipos e pseudotipos e formas naturais e recombinantes, exceto onde exigido de outra maneira. Tal como utilizado na presente invenção, o termo "serótipo" se refere a um AAV que é identificado por e distinguido de outros AAVs com base na reatividade da proteína de capsídeo com antissoros definidos, por exemplo, há oito serótipos conhecidos de AAVs de primata, AAV-1 a AAV-8. Por exemplo, o serótipo AAV2 é utilizado para se referir a um AAV que contém as proteínas de capsídeo codificadas do gene Cap de AAV2 e um genoma que contém ITRs das sequências de 5' e 3' do mesmo serótipo AAV2. Tal como utilizado na presente invenção, por exemplo, o rAAV pode ser utilizado para se referir a um AAV que contém proteínas de capsídeo e 5'-3' ITRs do mesmo serótipo, ou pode se referir a um AAV que tem proteínas de capsídeo de e 5'-3 'ITRs de um serótipo de AAV diferente, por exemplo, capsídeo do serótipo de AAV 2 e ITRs do serótipo de AAV 5. Para cada exemplo ilustrado na presente invenção, a descrição do projeto e da produção do vetor descreve o serótipo de capsídeo e das sequências de ITR 5'-3'. A

abreviatura "rAAV" se refere ao vírus adenoassociado recombinante, também denominado vetor de AAV recombinante (ou "vetor de rAAV").

[0099] Um "vírus de AAV" ou uma "partícula viral de AAV" se refere a uma partícula viral composta de pelo menos uma proteína de capsídeo de AAV (de preferência por todas as proteínas de capsídeo de AAV do tipo selvagem) e um polinucleotídeo encapsulado. Se a partícula compreende o polinucleotídeo heterólogo (isto é, um polinucleotídeo à exceção de um genoma de AAV do tipo selvagem tal como um transgene a ser aplicado a uma célula de mamífero), é tipicamente denominada "rAAV".

[00100] Em uma modalidade, os vetores de expressão de AAV são construídos utilizando técnicas conhecidas para prover pelo menos, como componentes ligados de modo operativo na direção da transcrição, os elementos de controle que incluem uma região de iniciação transcricional, o DNA de interesse e uma região de terminação transcricional. Os elementos de controle são selecionados para serem funcionais em uma célula de mamífero. A construção resultante que contém os componentes ligados de modo operativo é flanqueada (5' e 3') com sequências de ITR do AAV funcionais.

[00101] Por "repetições de terminal invertido do vírus adenoassociado" ou "ITRs do AAV" entenda-se as regiões reconhecidas na técnica encontradas em cada extremidade do genoma de AAV que funcionam junto em *cis* como origens de replicação do DNA e como sinais de empacotamento para o vírus. As ITRs do AAV, junto com a região de codificação de rep de AAV, conferem a excisão e o resgate e a integração eficiente de uma sequência de nucleotídeos interposta entre duas ITRs de flanqueamento em um genoma da célula de mamífero.

[00102] As sequências de nucleotídeos das regiões de AAV ITR são conhecidas. Tal como utilizado na presente invenção, uma "ITR do

AAV" não precisa ter a sequência de nucleotídeos do tipo selvagem descrita, mas pode ser alterada, por exemplo, por meio de inserção, eliminação ou substituição dos nucleotídeos. Além disso, a ITR do AAV pode ser derivada de qualquer um de diversos serótipos de AAV, incluindo, sem limitação, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Além disso, 5' e 3' ITRs que flanqueiam uma sequência selecionada de nucleotídeos em um vetor de AAV não precisam ser necessariamente idênticas ou derivadas do mesmo serótipo ou isoladas de AAV, contanto que funcionem como pretendido, isto é, permitam a excisão e o resgate da sequência de interesse de um genoma ou vetor da célula hospedeira e permitam a integração da sequência heteróloga no genoma da célula receptora quando os produtos do gene Rep de AAV estiverem presentes na célula.

[00103] Em uma modalidade, as ITRs do AAV podem ser derivadas de qualquer um de diversos serótipos de AAV, incluindo, sem limitação, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Além disso, 5' e 3' ITRs que flanqueiam uma sequência selecionada de nucleotídeos em um vetor de expressão de AAV não precisam ser necessariamente idênticas ou derivadas do mesmo serótipo ou isoladas do AAV, contanto que funcionem como pretendido, isto é, permitam a excisão e o resgate da sequência de interesse de um genoma ou vetor da célula hospedeira e permitam a integração da molécula do DNA no genoma da célula receptora quando os produtos do gene Rep de AAV estiverem presentes na célula.

[00104] Em uma modalidade, os capsídeos de AAV podem ser derivados de AAV2. As moléculas de DNA apropriadas para o uso em vetores de AAV terão menos de cerca de 5 quilobases (kb), menos de cerca de 4,5 kb, menos de cerca de 4kb, menos de cerca de 3,5 kb, menos de cerca de 3 kb, menos de cerca de 2,5 kb de tamanho, e são conhecidas no estado da técnica.

[00105] Em uma modalidade, a sequência de nucleotídeos selecionada é ligada de modo operativo para controlar os elementos que dirigem a transcrição ou a expressão dos mesmos no indivíduo *in vivo*. Tais elementos de controle podem compreender as sequências de controle associadas normalmente com o gene selecionado. Alternativamente, as sequências de controle heterólogo podem ser empregadas. As sequências de controle heterólogo úteis incluem, geralmente, aquelas derivadas das sequências que codificam genes de mamífero ou virais. Os exemplos incluem, mas não são limitados ao promotor inicial SV40, promotor de LTR do vírus de tumor mamário de camundongo; promotor tardio principal de adenovírus (Ad MLP); promotor do vírus da herpes simples (HSV), promotor de citomegalovírus (CMV) tal como a região do promotor inicial imediata de CMV (CMVIE), promotor do sarcoma de Rous (RSV), promotores de pol II, promotores de pol III, promotores sintéticos, promotores híbridos e outros ainda. Além disso, as sequências derivadas de genes não virais, tais como o gene de metalotioneína murino, também encontrarão uso na presente invenção. Tais sequências de promotor estão comercialmente disponíveis junto à, por exemplo, Stratagene (San Diego, Califórnia).

[00106] Em uma modalidade, ambos os promotores heterólogos e outros elementos de controle, tais como os promotores indutíveis e específicos do SNC, intensificadores e outros ainda, serão de uso particular. Os exemplos de promotores heterólogos incluem o promotor de CMV. Os exemplos de promotores específicos do SNC incluem aqueles isolados dos genes da proteína básica de mielina (MBP), da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e da enolase específica do neurônio (NSE). Os exemplos de promotores indutíveis incluem elementos responsivos do DNA para ecdisona, tetraciclina, hipóxia e aufina.

[00107] Em uma modalidade, o vetor de expressão de AAV que

abriga a molécula de DNA de interesse ligada pelas ITRs do AAV, pode ser construído diretamente pela introdução da(s) sequênci(a)s selecionada(s) em um genoma de AAV que teve os quadros abertos de leitura ("ORFs") principais de AAV excisados do mesmo. Outras porções do genoma de AAV também podem ser suprimidas, contanto que uma porção suficiente das ITRs permaneça para permitir a replicação e as funções de empacotamento. Tais construtos podem ser projetados utilizando as técnicas bem conhecidas no estado da técnica.

[00108] Alternativamente, as ITRs do AAV podem ser excisadas do genoma viral ou de um vetor de AAV que contém os mesmos e fundidas em 5' e 3' de um construto de ácido nucleico selecionado que está presente em outro vetor utilizando as técnicas de ligação padrão. Por exemplo, as ligações podem ser realizadas em 20 mM de Tris-Cl ao pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 33 µg/mL de BSA, 10 nM-50 nM de NaCl e 40 uM de ATP, 0,01-0,02 unidades (Weiss) de ligase do DNA T4 a 0°C (para a ligação de "extremidade pegajosa") ou 1 mM de ATP, 0,3-0,6 unidades (Weiss) de ligase do DNA T4 a 14°C (para a ligação "de extremidade sem corte"). As ligações intermoleculares de "extremidade pegajosa" são geralmente executadas em 30-100 µg/mL de concentrações totais do DNA (5-100 nM da concentração de extremidade total).

[00109] Vetores de AAV que contêm ITRs.

[00110] Além disso, os genes quiméricos podem ser produzidos sinteticamente para incluir sequências de ITR do AAV arranjadas a 5' e 3' de uma ou mais sequências de ácido nucleico selecionadas. Os códons preferidos para a expressão da sequência do gene químérico em células de mamífero do SNC podem ser utilizados. A sequência químérica completa é montada a partir dos oligonucleotídeos de sobreposição preparados pelos métodos padrão.

[00111] A fim de produzir vírions de rAAV, um vetor de expressão de AAV é introduzido em uma célula hospedeira apropriada utilizando as técnicas conhecidas, como por meio de transfecção. Uma série de técnicas de transfecção é geralmente conhecida no estado da técnica. Vide, por exemplo, Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York. Os métodos de transfecção particularmente apropriados incluem coprecipitação de fosfato de cálcio, microinjeção direta em células cultivadas, eletroporação, transferência genética mediada por lipossomo, transdução mediada por lipídeo e aplicação de ácido nucleico utilizando microprojéteis de alta velocidade.

[00112] Em uma modalidade, as células hospedeiras apropriadas para produzir vírions do rAAV incluem micro-organismos, células de levedura, células de inseto e células de mamífero, que podem ser ou ter sido utilizadas como receptores de uma molécula de DNA heterólogo. O termo inclui a progénie da célula original que foi transfetada. Desse modo, uma "célula hospedeira", tal como utilizado na presente invenção, se refere, de modo geral, a uma célula que foi transfetada com uma sequência de DNA exógeno. As células de linhagens de células humanas estáveis, 293 (prontamente disponível, por exemplo, através da American Type Culture Collection sob o número de acesso ATCC CRL1573) podem ser utilizadas na prática da presente invenção. Em particular, a linhagem de células humanas 293 é uma linhagem de células renais embriônicas humanas que foram transformadas com fragmentos do DNA de adenovírus do tipo 5 e expressam os genes adenovirais de E1a e E1b. A linhagem de células 293 é prontamente transfetada e provê uma plataforma particularmente conveniente na qual se pode produzir vírions do rAAV.

[00113] Por "região de codificação de Rep de AAV" entenda-se a região reconhecida na técnica do genoma de AAV que codifica as

proteínas da replicação Rep 78, Rep 68, Rep 52 e Rep 40. Foi mostrado que estes produtos da expressão de Rep têm muitas funções, incluindo o reconhecimento, a ligação e a clivagem hidrolítica da origem de AAV da replicação do DNA, da atividade de helicase do DNA e da modulação da transcrição dos promotores de AAV (ou outros heterólogos). Os produtos da expressão de Rep são coletivamente requeridos para replicar o genoma de AAV. Os homólogos apropriados da região de codificação de Rep de AAV incluem o gene Rep do vírus da herpes humano 6 (HHV-6), que também é conhecido por mediar a replicação do DNA de AAV2.

[00114] Por "região de codificação de tampão de AAV" entenda-se a região reconhecida na técnica do genoma de AAV que codifica as proteínas VP1, VP2 e VP3 do capsídeo ou homólogos funcionais destas. Estes produtos da expressão Cap conferem as funções de empacotamento que são coletivamente requeridas para o empacotamento do genoma viral.

[00115] Em uma modalidade, as funções auxiliares do AAV são introduzidas na célula hospedeira ao transfetar a célula hospedeira com um construto auxiliar de AAV antes ou simultaneamente com a transfecção do vetor de expressão de AAV. Os construtos auxiliares de AAV são utilizados, desse modo, para prover a expressão pelo menos transitória de genes Rep e/ou Cap de AAV para complementar as funções de AAV faltantes que são necessárias para a infecção produtiva de AAV. Os construtos auxiliares de AAV não têm as ITRs do AAV e não podem exercer as ações de replicar nem empacotar. Estes construtos podem estar na forma de um plasmídeo, fago, transponon, cosmídeo, vírus ou vírion. Uma série de construtos auxiliares de AAV foi descrita, tal como os plasmídeos geralmente utilizados pAAV/Ad e pIM29+45 que codificam os produtos da expressão de Rep e Cap. Uma série de outros vetores foi descrita, os

quais codificam os produtos da expressão de Rep e/ou Cap.

[00116] Os métodos de aplicação dos vetores virais incluem a ação de injetar o AAV no CSF. De modo geral, os vírions do rAAV podem ser introduzidos nas célula do SNC utilizando técnicas de transdução *in vivo* ou *in vitro*. Se transduzida *in vitro*, a célula receptora desejada será removida do indivíduo, transduzida com vírions do rAAV e reintroduzida no indivíduo. Alternativamente, as células singênicas ou xenogênicas podem ser utilizadas onde estas células não gerem uma resposta imune imprópria no indivíduo.

[00117] Foram descritos métodos apropriados para a aplicação e a introdução de células transduzidas em um indivíduo. Por exemplo, as células podem ser transduzidas *in vitro* ao combinar vírions de AAV recombinantes com as células do SNC, por exemplo, em um meio apropriado, e a seleção das células que abrigam o DNA de interesse pode ser feita utilizando as técnicas convencionais selecionadas tais como transferências Southern e/ou PCR ou utilizando marcadores selecionáveis. As células transduzidas podem ser então formuladas em composições farmacêuticas, descritas mais amplamente a seguir, e na composição introduzida no indivíduo por meio de várias técnicas, como por enxerto, injeção intramuscular, intravenosa, subcutânea e intraperitoneal.

[00118] Em uma modalidade, as composições farmacêuticas compreenderão um material genético suficiente para produzir uma quantidade terapeuticamente eficaz de ácido nucleico de interesse, isto é, uma quantidade suficiente para reduzir ou melhorar os sintomas do estado da doença em questão ou uma quantidade suficiente para conferir o benefício desejado. As composições farmacêuticas também conterão um excipiente farmaceuticamente aceitável. Tais excipientes incluem qualquer agente farmacêutico que não induza a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição e que

possa ser administrado sem toxicidade imprópria. Os excipientes farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não se limitam a sorbitol, Tween 80 e líquidos tais como água, solução salina, glicerol e etanol. Os sais farmaceuticamente aceitáveis podem ser aqui incluídos, por exemplo, sais de ácidos minerais tais como cloridretos, bromidretos, fosfatos, sulfatos e outros ainda; e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e outros ainda. Além disso, as substâncias auxiliares, tais como os agentes de umidificação ou de emulsificação, as substâncias de tamponamento do pH e outros ainda, podem estar presentes em tais veículos. Uma discussão completa sobre os excipientes farmaceuticamente aceitáveis está disponível em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack. Pub. Co., N.J. 1991).

[00119] Tal como é evidente aos elementos versados na técnica em vista dos ensinamentos deste relatório descritivo, uma quantidade eficaz do vetor viral que deve ser adicionada pode ser empiricamente determinada. A administração pode ser efetuada em uma dose, contínua ou intermitentemente durante todo o curso do tratamento. Os métodos para determinar os dispositivos e as dosagens mais eficazes de administração são bem conhecidos pelos elementos versados na técnica e variarão de acordo com o vetor viral, a composição da terapia, as células alvo e o indivíduo que está sendo tratado. Administrações únicas e múltiplas podem ser realizadas com o nível e o padrão de dose selecionado pelo médico responsável pelo tratamento.

[00120] Deve ser compreendido que mais de um transgene pode ser expresso pelo vetor viral aplicado. Alternativamente, vetores separados, cada um expressando um ou mais transgenes diferentes, também podem ser aplicados ao SNC, como descrito na presente invenção. Além disso, pretende-se também que os vetores virais

aplicados pelos métodos da presente invenção sejam combinados com outras composições e terapias apropriadas.

Métodos para a Introdução de Material Genético nas Células

[00121] O material genético exógeno (por exemplo, um DNA que codifica uma ou mais proteínas terapêuticas) é introduzido na célula *ex vivo* ou *in vivo* por meio dos métodos de transferência genética, tais como transfecção ou transdução, para prover uma célula geneticamente modificada. Vários vetores de expressão (isto é, veículos para facilitar a aplicação do material genético exógeno a uma célula alvo) são conhecidos pelos elementos versados na técnica.

[00122] Tal como utilizado na presente invenção, a "transfecção das células" se refere à aquisição por uma célula de novo material genético pela incorporação do DNA adicionado. Desse modo, a transfecção se refere à inserção do ácido nucleico em uma célula utilizando métodos físicos ou químicos. Diversas técnicas de transfecção são conhecidas pelos elementos versados na técnica, incluindo: coprecipitação do DNA de fosfato de cálcio; DEAE-dextrano; eletroporação; transfecção catiônica mediada por lipossomo; e bombardeamento de micropartículas facilitado pelas partículas de tungstênio. A coprecipitação do DNA de fosfato de estrônio é outro método de transfecção possível.

[00123] Por outro lado, a "transdução de células" se refere ao processo de transferir o ácido nucleico em uma célula utilizando um vírus do DNA ou do RNA. Um vírus do RNA (isto é, um retrovírus) para transferir um ácido nucleico em uma célula é aqui denominado retrovírus quimérico de transdução. O material genético exógeno contido dentro do retrovírus é incorporado ao genoma da célula transduzida. Uma célula que é transduzida com um vírus do DNA quimérico (por exemplo, um adenovírus que carrega um DNA que codifica um agente terapêutico), não tem o material genético exógeno incorporado em seu genoma, mas pode expressar o material genético

exógeno que é retido extracromossomicamente dentro da célula.

[00124] Tipicamente, o material genético exógeno inclui o gene heterólogo (geralmente na forma de um DNA que compreende os éxons que codificam a proteína terapêutica) junto com um promotor para controlar a transcrição do novo gene. O promotor tem, caracteristicamente, uma sequência específica de nucleotídeos necessária para iniciar a transcrição. Opcionalmente, o material genético exógeno inclui adicionalmente sequências adicionais (isto é, intensificadores) requeridas para obter a atividade de transcrição do gene desejada. Para as finalidades desta discussão, um "intensificador" é simplesmente qualquer sequência não traduzida do DNA que trabalha contígua com a sequência de codificação (em *cis*) para mudar o nível basal da transcrição ditado pelo promotor. O material genético exógeno pode ser introduzido no genoma da célula imediatamente a jusante do promotor, de modo que a sequência do promotor e de codificação é ligada de modo operativo para permitir a transcrição da sequência de codificação. Um vetor de expressão retroviral pode incluir um elemento do promotor exógeno para controlar a transcrição do gene exógeno introduzido. Tais promotores exógenos incluem promotores constitutivos e indutíveis.

[00125] Os promotores constitutivos naturais controlam a expressão das funções essenciais da célula. Em consequência disto, um gene sob o controle de um promotor constitutivo é expresso sob todas as condições do crescimento da célula. Os promotores constitutivos exemplificadores incluem os promotores para os seguintes genes que codificam determinadas funções constitutivas ou "tarefas domésticas": transferase de fosforibosil hipoxantina (HPRT), reductase de diidrofolato (DHFR), deaminase de adenosina, quinase de fosfoglicerol (PGK), quinase de piruvato, mutase de fosfoglicerol, promotor de actina e outros promotores constitutivos conhecidos pelos elementos versados na técnica. Além disso, muitos promotores virais funcionam

constitutivamente em células eucarióticas. Estes incluem: os promotores iniciais e tardios de SV40; as repetições de terminal longo (LTRs) do vírus da leucemia de Moloney e outros retrovírus; e o promotor da quinase de timidina do vírus de herpes simples, entre muitos outros. Consequentemente, alguns dos promotores constitutivos acima mencionados podem ser utilizados para controlar a transcrição de uma inserção de gene heterólogo.

[00126] Genes que estão sob o controle de promotores indutíveis são expressos somente em ou a um grau maior, na presença de um agente de indução, (por exemplo, a transcrição sob o controle do promotor de metalotioneína é bastante aumentada na presença de determinados íons de metal). Os promotores indutíveis incluem os elementos responsivos (REs) que estimulam a transcrição quando seus fatores de indução são ligados. Por exemplo, há REs para fatores do soro, hormônios esteroides, ácido retinoico e AMP cíclico. Os promotores que contêm um RE particular podem ser escolhidos a fim de obter uma resposta induzível e, em alguns casos, os próprios REs podem ser unidos a um promotor diferente, conferindo desse modo indutibilidade ao gene recombinante. Desse modo, ao selecionar o promotor apropriado (constitutivo versus induzível; forte versus fraco), é possível controlar a existência e o nível de expressão de um agente terapêutico na célula geneticamente modificada. Se o gene que codifica o agente terapêutico estiver sob o controle de um promotor induzível, a aplicação do agente terapêutico *in situ* será provocada ao expor a célula geneticamente modificada *in situ* às condições que permitam a transcrição do agente terapêutico, por exemplo, pela injeção intraperitoneal de indutores específicos dos promotores indutíveis que controlam a transcrição do agente. Por exemplo, a expressão *in situ* pelas células geneticamente modificadas de um agente terapêutico codificado por um gene sob o controle do promotor

de metalotioneína, é intensificado ao contatar as células geneticamente modificadas com uma solução que contém (isto é, induz) os íons de metal apropriados *in situ*.

[00127] Consequentemente, a quantidade de agente terapêutico que é aplicado *in situ* é regulada ao controlar fatores como: (1) a natureza do promotor utilizado para dirigir a transcrição do gene introduzido, (isto é, se o promotor é constitutivo ou induzível, forte ou fraco); (2) o número de cópias do gene exógeno que é introduzido na célula; (3) o número de células transduzidas/transfetadas que são administradas (por exemplo, implantadas) no paciente; (4) o tamanho do implante (por exemplo, enxerto ou sistema de expressão encapsulado); (5) o número de implantes; (6) o período de tempo que as células transduzidas/transfetadas ou implantes são deixados no lugar; e (7) a taxa de produção do agente terapêutico pela célula geneticamente modificada. Considera-se que a seleção e otimização destes fatores para a aplicação de uma dose terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico particular estejam dentro do âmbito de um elemento versado na técnica, sem experimentação imprópria, ao levar em conta os fatores acima descritos e o perfil clínico do paciente.

[00128] Além de pelo menos um promotor e pelo menos um ácido nucleico heterólogo que codificam o agente terapêutico, o vetor de expressão pode incluir um gene de seleção, por exemplo, um gene de resistência à neomicina, para facilitar a seleção das células que foram transfetadas ou transduzidas com o vetor de expressão. Alternativamente, as células são transfetadas com dois ou mais vetores de expressão, pelo menos um vetor contendo o(s) gene(s) que codifica(m) o(s) agente(s) terapêutico(s), sendo que o outro vetor contém um gene de seleção. Considera-se que a seleção de um promotor, intensificador, gene de seleção e/ou sequência de sinal apropriada (descrita abaixo) esteja dentro do âmbito de um elemento

versado na técnica, sem experimentação imprópria.

[00129] O agente terapêutico pode ser alvejado para a aplicação a uma posição extracelular, intracelular ou de membrana. Se for desejável que o produto do gene seja secretado das células, o vetor de expressão será projetado para incluir uma sequência de "sinal" de secreção apropriada para secretar o produto do gene terapêutico a partir da célula no extracelular. Se for desejável que o produto do gene seja retido dentro da célula, esta sequência de sinal de secreção será omitida. De modo similar, o vetor de expressão pode ser construído para incluir sequências de sinal de "retenção" para escorar o agente terapêutico dentro da membrana plasmática celular. Por exemplo, todas as proteínas da membrana têm regiões transmembrana hidrofóbicas, que interrompem o translocação da proteína na membrana e não permitem que a proteína seja secretada. Considerase que a construção de um vetor de expressão incluindo as sequências de sinal para alvejar um produto do gene a uma posição particular esteja dentro do âmbito de um elemento versado na técnica, sem a necessidade de experimentação imprópria.

Exemplo 1

Mudanças na Progressão da Deposição Amiloide

[00130] Este exemplo estudou as mudanças na progressão da deposição amiloide em camundongos APP/PS após a superexpressão de diferentes isoformas de ApoE através de injeção intraventricular de um serótipo do vírus adenoassociado 4 (AAV4).

[00131] O alelo epsilon 4 de ApoE (ApoE ε4) é o primeiro fator de risco genético para o mal de Alzheimer (MA), ao passo que a herança do alelo epsilon 2 raro de ApoE (ApoE ε2) reduz este risco em cerca de metade. No entanto, apesar da verificação destes indícios genéticos fortes há quase 17 anos, os mecanismos por meio dos quais ApoE confere risco permanecem incertos.

[00132] A fim de decifrar como as isoformas diferentes de ApoE (ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$) impactam a formação e a estabilidade de chapas amiloides fibrilares, vetores AAV4 que codificam cada isoforma de ApoE foram injetados no ventrículo de camundongos APP/OS com 7 meses de idade. Utilizando geração de imagens de multifótons *in vivo*, as populações de depósitos amiloides foram rastreadas na linha de base e após a exposição a ApoE durante um intervalo de dois meses, permitindo desse modo uma visão dinâmica da progressão da amiloidose em um animal vivo.

[00133] Foi observado que a cinética de deposição da chapa amiloide é variável de acordo com cada isoforma, de modo que os camundongos injetados com ApoE $\epsilon 4$ tiveram um aumento de 38% de chapas senis, ao passo que os camundongos tratados com ApoE $\epsilon 2$ apresentaram uma diminuição de 15% no número de depósitos amiloides em comparação a ApoE $\epsilon 3$ após 2 meses. A análise pós-morte confirmou estes resultados e revelou a presença das proteínas humanas de ApoE que decoram as chapas no córtex, refletindo uma grande difusão da proteína em todo o parênquima e sua acumulação focal onde os peptídeos A β são depositados. É importante observar que este teor aumentado da proteína de ApoE $\epsilon 4$ também foi associado com uma perda mais grave de sinapse em torno dos depósitos amiloides.

[00134] De modo geral, os presentes dados demonstraram que a superprodução de isoformas diferentes de ApoE poderia influenciar a progressão da doença e poderia modular a extensão da perda de sinapse, um dos parâmetros que se correlaciona melhor com a degeneração cognitiva em pacientes com MA.

[00135] *A injeção intraventricular de AAV4-ApoE conduziu a uma expressão estável de huApoE e a uma detecção sustentada da proteína de ApoE humana recombinante (huApoE) no cérebro.*

[00136] Em resumo, o GFP e a huApoE foram imundetectados nos camundongos APP/PS injetados com os vetores AAV4. O sinal de GFP poderia ser observado na área ventricular inteira (painel superior) e nas células de revestimento do ventrículo, bem como a APOE humana.

[00137] A fim de avaliar a presente abordagem, AAV4-Venus (controle), -ApoE2, -ApoE3 e -ApoE4 foram injetados no ventrículo de camundongos do tipo selvagem. Dois meses após a injeção, as proteínas humanas de ApoE puderam ser detectadas no parênquima cortical em torno dos depósitos amiloïdes (observar o anticorpo 3H1; apenas uma base não específica foi observada em camundongos injetados com AAV4-GFP). Desse modo, um nível significativo de ApoE humana foi detectado por ELISA no cérebro, e os tingimentos imuno-histológicos para Venus e ApoE confirmaram a expressão dos diferentes transgenes pelas células de revestimento do ventrículo.

[00138] Os experimentos de qRT-PCR foram executados a fim de avaliar os níveis de mRNA do transgene. Uma curva padrão permitiu determinar as concentrações do mRNA de huApoE de acordo com o nível de GAPDH endógeno. As amostras dos camundongos que foram expostos por 2 ou 5 meses foram incluídas. Um ensaio ELISA projetado para detectar especificamente a APOE humana foi executado nos homogenatos do cérebro (**Figura 1A**). Baixos níveis de proteínas recombinantes puderam ser detectados nos camundongos injetados com AAV4-APOE em comparação aos animais tratados com AAV4-GFP, como quantificado pela APOE humana específica de ELISA (**Figura 1B**) e confirmado por transferência Western.

[00139] 2. *Superexpressão de cada isoforma de APOE afeta diferencialmente a progressão da amiloidose.*

[00140] A geração de imagens de dois fôtons *in vivo* foi utilizada para seguir a deposição amiloide com o tempo em um animal vivo. Em resumo, os camundongos APP/PS (7 meses de idade) foram injetados

estereotaticamente com os vetores AAV4 que codificam ApoE2, ApoE3, ApoE4 e Venus. Após 1 semana, uma janela cranial foi implantada e os depósitos amiloïdes tiveram sua imagem tirada com o tempo após a craneotomia. Após 2 meses, os animais foram sacrificados, e as análises pós-morte foram executadas.

[00141] As imagens de dois fôtons dos camundongos APP/PS injetados com AAV4-ApoE2, AAV4-ApoE3 ou AAV4-ApoE4 foram preparadas. As chapas amiloïdes puderam ser detectadas após a injeção intraperitoneal de metóxi-XO₄ (5mg/kg), e Texas red dextran (70.000 Da de peso molecular; 12,5 mg/mL em PBS estéril) foi injetado em uma veia lateral da cauda para prover um angiograma fluorescente. As imagens foram tiradas uma semana (= T0), um mês e dois meses após a injeção. Os mesmos campos foram capturados com o tempo para seguir a progressão das lesões. Surgiram poucos novos depósitos amiloïdes, ao passo que poucos deles não puderam ser mais detectados durante um período de tempo de dois meses.

[00142] Uma análise completa das imagens *in vivo* mostra que o número de depósitos amiloïdes aumentou de modo significativamente mais rápido nos camundongos APP/PS injetados com AAV4-ApoE4 em comparação aos animais tratados com AAV4-ApoE3 e AAV4-Venus. Em contraste, uma densidade pequena mas significativa de diminuição das chapas foi medida quando AAV4-ApoE2 foi utilizado (**Figura 2**). Uma tendência para chapas maiores foi observada nos camundongos APP/PS injetados com AAV4-ApoE4 ($p<0,06$), mas no geral, o tamanho das chapas permaneceu constante. Os dados resumidos nas imagens *in vivo* mostram que a superexpressão de cada isoforma de APOE afeta diferencialmente a progressão da deposição amiloïde *in vivo*. A injeção de AAV4-ApoE2 conduz a uma diminuição ligeira na densidade amiloïde com o tempo, ao passo que a injeção de AAV4-ApoE4 agrava a amiloidose.

[00143] 3. O tamanho das chapas amiloïdes varia de acordo com cada isoforma de ApoE.

[00144] A geração de imagens de dois fótons permitiu as seguintes mudanças no tamanho de cada depósito amiloïde durante um período de 2 meses. O tamanho das chapas pode permanecer estável, aumentar ou diminuir com o tempo. As distribuições das relações de tamanho entre T1/T0 e T2/T1 mostram que há um deslocamento para chapas amiloïdes maiores nos camundongos injetados com AAV4-ApoE4 em comparação aos outros grupos (**Figura 3**).

[00145] 4. A avaliação pós-morte da carga amiloïde confirma os efeitos de ApoE2 e de ApoE4 sobre a deposição amiloïde.

[00146] Dois meses após a injeção AAV4, a avaliação estereológica pós-morte revelou que os animais injetados com AAV4-ApoE4 têm uma densidade mais elevada de chapas amiloïdes no córtex, ao passo que nenhuma diferença pôde ser detectada entre os outros grupos (**Figura 4A**). Este número aumentado de depósitos amiloïdes foi observado quando as chapas foram etiquetadas com ThioS ou Bam10. No entanto, nenhuma mudança na relação entre Bam10 e ThioS foi detectada. Cinco meses após a injeção, os efeitos de cada isoforma de ApoE ficaram mais marcantes em comparação aos dois meses (**Figura 4B**). Uma densidade aumentada significativa de depósitos foi observada quando os camundongos foram injetados com AAV4-ApoE4, ao passo que um efeito inverso foi detectado com ApoE2. Outra vez, nenhuma mudança na relação entre Bam10 e ThioS foi detectada.

[00147] 5. Cada isoforma de ApoE afeta diferencialmente a densidade sináptica em torno dos depósitos amiloïdes.

[00148] A tomografia de arranjo foi utilizada para determinar precisamente a densidade de elementos pré- e pós-sinápticos em torno dos depósitos amiloïdes. Este novo método de geração de

imagens oferece potencialidades para a geração de imagens de alta resolução da arquitetura molecular do tecido. A tomografia de arranjo se baseia na seção ultrafina do espécime (70nm), imunotintimento e reconstrução em 3D. As imagens da tomografia de arranjo representativas de amostras ficaram tingidas para a chapa amiloide e o marcador pós-sináptico PSD95. As imagens de tomografia de arranjo mostram que um número diminuído do marcador pós-sináptico PSD95 foi observado em torno dos depósitos amiloides, mas este efeito foi eliminado das chapas. A quantificação dos marcadores pré-(sinapsina-1) e pós-sinápticos na vizinhança ou distante das chapas foi determinada em cada grupo de camundongos injetados com AAV4 (**Figuras 5A-D**). A quantificação extensiva de elementos pré- e pós-sinápticos confirmou que uma densidade diminuída de sinapsina 1 e PSD95 foi associada com as chapas amiloides, sendo que este efeito é drasticamente amplificado quando a ApoE4 foi superexpressa no cérebro dos camundongos APP/PS1 (**Figura 5C, Figura 5D**). A superexpressão de ApoE4 é associada com uma perda aumentada na espinha em comparação com os outros grupos na vizinhança dos depósitos amiloides. Pelo contrário, a densidade de sinapsina puncta é mais elevada em animais tratados com ApoE2 em torno das chapas.

Conclusão

[00149] As injeções intraventriculares do vírus AAV serótipo 4 conduziram a uma superprodução sustentada e crônica de proteínas recombinantes solúveis em todo o parênquima cerebral. A superexpressão de ApoE2, ApoE3 e ApoE4 afetou diferencialmente o curso da patologia em camundongos APP/PS, de modo que a progressão da carga amiloide foi significativamente aumentada quando a ApoE4 foi injetada em comparação à ApoE3. Por outro lado, ApoE2 foi associado com efeitos protetores, e poucos depósitos amiloides não foram mais detectáveis dois meses após a injeção. A

análise imuno-histológica pós-morte confirmou o efeito adverso de ApoE4. A superprodução sustentada de ApoE4 exacerbou a perda de sinapse observada em torno dos depósitos amiloides em comparação à ApoE3, ao passo que ApoE2 teve um efeito suave. O presente estudo demonstrou uma conexão direta entre as isoformas de ApoE, a progressão da amiloidose e a perda da sinapse *in vivo*.

Exemplo 2

Tratamento de Distúrbios do Sistema Nervoso Central através do Fluido Cerebroespinal (CSF) em Mamíferos Grandes

[00150] A fim de obter a terapia genética para distúrbios cerebrais, tais como o mal de Alzheimer, foi necessário determinar se os níveis em longo prazo, de estado estacionário das enzimas terapêuticas poderiam ser obtidos em um mamífero. Foi verificado que as células ependimais (células que repousam os ventrículos no cérebro) podem ser transduzidas, e secretam uma enzima alvejada no fluido espinal cerebral (CSF). Determinou-se que o vírus adenoassociado (AAV4) pode transduzir o epêndima em um modelo de camundongo com eficiência elevada. (Davidson *et al.*, PNAS, **28**:3428-3432, 2000.) Nos camundongos, havia uma normalização dos níveis de substrato armazenados no cérebro doente após o tratamento com AAV4.

[00151] Foi investigado se a aplicação global de um vetor poderia ser eficazmente executada a fim de conseguir níveis de estado estacionário da enzima no CSF. Em primeiro lugar, precisava ser encontrado um vetor que pudesse transduzir as células ependimais (células de revestimento dos ventrículos) no cérebro de mamíferos maiores. Os estudos foram realizados em um modelo de cão de LINCL, e em um modelo de primata não humano de LINCL. Os cães de LINCL eram normais ao nascer, mas desenvolvem sinais neurológicos ao redor de 7 meses, déficits cognitivos testáveis com ~5-6 meses, convulsões aos 10-11 meses e perda visual progressiva.

[00152] Um vírus adenoassociado (AAV) foi selecionado como o vetor por causa de seu tamanho pequeno (20 nm). Grande parte de seu material genético pôde ser removido ("eviscerado"), de modo que nenhum gene viral estivesse presente e de modo que tivesse uma replicação incompetente. Foi previamente testado se os vetores do vírus adenoassociado do tipo 4 (AAV4) poderiam mediar incrementos funcionais e patológicos globais em um modelo murino de mucopolissacaridose do tipo VII (MPS VII), causada pela deficiência de beta-glucuronidase (Liu *et al.*, *J. Neuroscience*, 25(41):9321-9327, 2005). Os vetores de AAV4 recombinantes que codificam a beta-glucuronidase foram injetados unilateralmente no ventrículo lateral de camundongos de MPS VII com a doença estabelecida. O epêndima transduzido expressou níveis elevados da enzima recombinante, com a enzima secretada penetrando as estruturas cerebral e cerebelar, bem como o tronco encefálico. Os estudos imuno-histoquímicos revelaram associação íntima entre a enzima recombinante e a microvasculatura do cérebro, indicando que a beta-glucuronidase atingiu o parênquima do cérebro através dos espaços perivasculares que revestem os vasos sanguíneos. A aprendizagem associativa aversiva foi testada pelo condicionamento de medo contextual. Em comparação com os controles heterozigotos com correspondência de idade, os camundongos afetados mostraram uma resposta ao medo condicionada e discriminação de contexto prejudicada. Este déficit comportamental foi revertido 6 semanas após a transferência genética nos camundongos de MPS VII tratados com AAV4 beta-glucuronidase. Os dados mostram que as células ependimais podem servir como uma fonte de secreção da enzima no parênquima do cérebro e no CSF circunvizinhos.

[00153] Surpreendentemente, no entanto, quando estes estudos foram estendidos aos mamíferos grandes (isto é, cães e primatas não

humanos), os vetores AAV4 não foram eficazes em alvejar o epêndima nestes animais. Em vez disso, um vetor AAV2 precisou ser utilizado. Em resumo, rAAV2 foi gerado ao codificar TPP1 (AAV2-CLN2) e foi injetado intraventricularmente para transduzir o epêndima (Liu *et al.*, *J. Neuroscience*, 25(41):9321-9327, 2005). O TPP1 é a enzima deficiente em LINCL. Os dados indicaram que a transdução ependimal no cérebro de NHP resultou em um aumento significativo da enzima no CSF. Os resultados indicaram níveis elevados da atividade de TPP1 em várias regiões do cérebro, sendo que o eixo vertical mostra a % de controle da atividade (**Figura 7**).

[00154] No primeiro cão tratado, a aplicação do vetor foi insuficiente, mas ainda exibiu atividade de CLN2 no cérebro. Os cães subsequentes submeteram-se à aplicação de ICV com estereotaxia. Foi verificado que as capacidades cognitivas dos cães tratados foram incrementadas de maneira significativa com relação a um cão não tratado, como medido pelo desempenho de T-maze (**Figura 8**). Além disso, os efeitos da aplicação de ICV de AAV2-CLN2 no modelo de cão de LINCL foram bem marcantes. Nos animais não tratados (-/-), grandes ventrículos estavam presentes, ao passo que os cérebros do controle dos animais não tratados e tratados não exibiram ventrículos. Após a aplicação de AAV.TPP1 aos ventrículos de cães de LINCL, uma atividade detectável da enzima foi observada em várias regiões do cérebro, incluindo o cerebelo e a medula espinhal superior. Em dois cães afetados adicionais vivos, a atrofia do cérebro foi significativamente atenuada, a longevidade foi aumentada e a função cognitiva foi incrementada. Finalmente, em NHP, foi mostrado que este método pode obter níveis de atividade de TPP1 2 a 5 vezes acima do tipo selvagem.

[00155] Diversos vetores de AAV foram gerados e testados para determinar a combinação ideal de ITR e de capsídeo. Cinco

combinações diferentes foram produzidas, uma vez que foi determinado que a ITR de AAV2 era a mais eficaz: AAV2/1 (isto é, ITR de AAV2 e capsídeo de AAV1), AAV2/2, AAV2/4, AAV2/5 e AAV2/8. Foi verificado que AAV2/2 funcionou muito melhor nos mamíferos grandes (cães e NHP), seguido por AAV2/8, AAV2/5, AAV2/1 e AAV2/4. Isto foi bastante surpreendente, uma vez que a ordem de eficácia dos vetores virais é o oposto daquela observada nos camundongos.

[00156] Desse modo, o presente trabalho mostrou que as células de revestimento ventricular podem ser uma fonte de enzima recombinante no CSF para a distribuição em todo o cérebro e que o AAV2/2 é um veículo eficaz para administração dos agentes terapêuticos, tais como o gene que codifica CLN2 (TPP1) nos cães e em primatas não humanos.

Exemplo 3

Isoformas de APOE Humana Aplicados através da Transferência Genética Modulam Diferencialmente o Mal de Alzheimer ao Afetar a Deposição, a Depuração e a Neurotoxicidade Amiloide

[00157] O mal de Alzheimer (MA) é o distúrbio neurodegenerativo relacionado à idade mais frequente e tornou-se uma preocupação importantíssima de saúde pública. Entre os genes de susceptibilidade associados com a forma esporádica de início tardio de MA, o alelo da apolipoproteína E ε4 (APOE - gene; ApoE - proteína) é de longe o fator de risco genético mais significativo. A presença de uma cópia de APOE ε4 aumenta substancialmente o risco de desenvolver a doença em um fator de 3 em comparação ao alelo APOE ε3 mais comum, ao passo que duas cópias conduzem a um aumento de doze vezes. Intrigantemente, a APOE ε2 tem um impacto oposto e é um fator protetor, de modo que a herança deste alelo específico diminui o risco ajustado pela idade de MA cerca de pela metade em comparação a

APOE3/3. A idade média de início da demência também corresponde a estes perfis de risco, com os portadores de APOE4/4 tendo um início em seus portadores na metade dos anos sessenta e em APOE2/3 no início dos anos noventa, um deslocamento de quase três décadas, ao passo que os indivíduos de APOE3/3 têm uma idade de início intermediária – nos anos setenta.

[00158] O mecanismo por meio do qual a ApoE impacta o MA é controverso. Acredita-se que a acumulação de A β contendo chapas senis no hipocampo e no córtex dos pacientes desempenha um papel central no MA, uma vez que todos os genes conhecidos responsáveis pelas formas dominantes autossômicas raras da doença participam na produção de peptídeos A β . Interessantemente, foi mostrado que o genótipo de APOE afeta fortemente a extensão da deposição amiloide nos pacientes com MA, bem como a quantidade de A β oligomérico solúvel neurotóxico detectado em amostras de autópsia. Foi sugerido que as isoformas de ApoE influenciam a integridade cerebrovascular e afetam diferencialmente o efluxo dos peptídeos A β através da barreira hematoencefálica, modulando desse modo o acúmulo de agregados amiloides em torno dos vasos sanguíneos (angiopatia amiloide cerebral ou AAC). Além disso, a ApoE também foi diretamente implicada na neurodegeneração e na plasticidade neuronal. Os efeitos de ApoE2 foram relativamente pouco estudados nestes contextos.

[00159] Os animais geneticamente projetados que expressam a APOE2, -E3 e -E4 humana têm uma ordem de classificação similar do fardo amiloide como humanos, consistentemente com a hipótese que diferentes isoformas de ApoE impactam a iniciação e/ou o crescimento da chapa. No entanto, estudos adicionais são necessários para dissecar os mecanismos dos efeitos mediados pela ApoE sobre os depósitos amiloides existentes e na neurodegeneração vigente. Para superar esta lacuna no conhecimento, foi utilizada uma abordagem de transferência

genética em que os vetores do vírus adenoassociados que expressam os vários alelos de APOE (ou o controle de GFP) são injetados no ventrículo lateral principalmente para transduzir o epêndima, que age então como uma fábrica biológica para aplicar a ApoE dentro dos fluidos cerebroespinal e intersticial. Em seguida, foi utilizada a microscopia de multifótons intravital para rastrear os efeitos de várias isoformas de ApoE sobre a formação e o crescimento da chapa e, no caso da ApoE2, a dissolução, bem como em abordagens de microdiálise *in vivo* par monitorar as variáveis bioquímicas de ApoE e A β no ISF, e tomografia de arranjo, para avaliar as mudanças na neurotoxicidade associada a A β . Foi verificado que as isoformas de ApoE impactam os níveis de A β oligomérico solúvel no ISF, o ritmo da fibrilização e deposição de A β , a estabilidade de depósitos amiloides uma vez formados, sua depuração e a extensão de efeitos neurotóxicos de peri-chapa. Certamente, os camundongos de MA tratados com ApoE4 mostram uma quantidade intensificada de A β solúvel, uma densidade mais elevada de chapas fibrilares, uma exacerbação da perda do elemento sináptico e um número aumentado de distrofias neuríticas em torno de cada depósito, ao passo que um efeito protetor relativo foi observado com ApoE2. Estes dados suportam a hipótese que os alelos de APOE mediam seu efeito no MA principalmente através de A β e destacam a ApoE como um alvo terapêutico.

RESULTADOS

[00160] A injeção intraventricular de AAV4-APOE conduz à expressão estável de APOE e à produção sustentada de ApoE humana no cérebro.

[00161] A apolipoproteína E é uma proteína naturalmente secretada, produzida principalmente pelos astrócitos e pelas células microgliais, e pode se difundir por todo o parênquima cerebral. Aproveitando esta propriedade ao injetar um serótipo 4 de AAV de

codificação para GFP (controle) ou cada alelo APOE nos ventrículos cerebrais laterais de camundongos APP/PS1 com 7 meses de idade. Considerando as grandes áreas cerebrais afetadas pelas lesões características do MA, esta estratégia ofereceu uma grande vantagem se comparada às múltiplas injeções intraparenquimais.

[00162] Dois meses após a injeção, as células transduzidas foram detectadas no plexo coroide e no epêndima que reveste o ventrículo, confirmando desse modo a funcionalidade dos vetores AAV4. Utilizando anticorpos específicos para cada espécie, proteínas de ApoE humanas e de murinos também foram detectadas por ELISA (**Figura 9A, 9B e 15A**) e por transferência Western. Foi observado que a concentração de apolipoproteína humana E atingiu 20 µg/mg da proteína total em média (**Figura 9A**), representando cerca de 10% de ApoE de murino endógena (**Figura 9B**). A presença desta modesta quantidade adicional de ApoE humana não alterou detectavelmente os níveis da proteína de ApoE de murino endógena (**Figura 15A**). Uma diminuição pequena mas significativa foi estatisticamente observada entre 2 e 5 meses após a injeção com AAV4 (**Figura 15B**). Entretanto, os níveis da proteína humana permaneceram detectáveis em comparação ao grupo de controle, sugerindo que a transdução mediada por AAV4 ofereceu uma plataforma para a produção sustentada da proteína recombinante secretada em todo o parênquima. Certamente, as proteínas humanas de ApoE puderam ser detectadas em torno dos depósitos amiloides dos camundongos APP/PS1 em todo o manto cortical, onde se sabe que a proteína de ApoE de murino endógena tende a se acumular.

[00163] Em seguida, a presença de ApoE humana no fluido intersticial (ISF) foi avaliada, um compartimento extracelular que também contém espécies solúveis de A β alta e biologicamente ativas. Por causa da quantidade relativamente pequena de ApoE detectada

no líquido cerebral intelecto, diversos camundongos de KO de apoE receberam via injeção cada vetor de AAV4-APOE, e a presença da proteína humana foi rastreada utilizando anticorpos altamente sensíveis, mas não específicos de espécie. Utilizando uma técnica de microdiálise, a presença de ApoE no ISF foi confirmada nos animais de KO injetados com apoE.

[00164] Em suma, estes dados confirmam que uma única injeção intracerebroventricular de AAV4 foi suficiente para conduzir à produção sustentada de uma proteína de interesse em todo o parênquima cerebral e dentro do ISF e que o plexo epêndima/coroide pode ser utilizado como uma "bomba biológica" para aplicar as proteínas potencialmente terapêuticas ao cérebro.

[00165] A infusão das isoformas de ApoE afeta diferencialmente os peptídeos amiloides e a deposição da chapa.

[00166] Os camundongos APP/PS1 foram transduzidos com os vetores que expressam GFP ou várias isoformas de ApoE por 5 meses antes da eutanásia. Uma análise de carga da chapa amiloide revelou que, após cinco meses, um aumento significativo na densidade dos depósitos amiloides foi observado no córtex dos animais injetados com AAV4-APOE4 em comparação àqueles que expressam APOE2. A densidade da chapa em AAV4-GFP e nos camundongos tratados com AAV4-APOE3 não foi diferente uma da outra em um nível intermediário (**Figura 16A**).

[00167] As concentrações dos peptídeos $\text{A}\beta_{40}$ e $\text{A}\beta_{42}$ medidas a partir dos extratos de ácido fórmico imitaram as mudanças observadas no teor das chapas amiloides, de modo que uma concentração aumentada de peptídeos amiloides foi verificada nos camundongos que expressam o alelo APOE4 (**Figura 16B**), e um efeito oposto foi detectado com a APOE2 após 5 meses. O teor dos peptídeos $\text{A}\beta_{40}$ e $\text{A}\beta_{42}$ na fração solúvel de TBS foi similarmente afetado pela injeção de

cada AAV-APOE (**Figura 16C**). Além disso, a relação entre os peptídeos A β agregados e solúveis permaneceu inalterada pela exposição à ApoE, sugerindo desse modo que a superexpressão de cada isoforma humana distinta de ApoE modula concomitantemente a espécie amiloide fibrilar e solúvel.

[00168] A superexpressão de cada isoforma de ApoE por somente 2 meses conduz a efeitos menores do que os observados no estudo de 5 meses. No entanto, um aumento significativo na densidade da chapa amiloide dentro da área cortical dos camundongos injetados com AAV4-APOE4 foi observado em comparação aos outros grupos experimentais (**Figura 16A**). Isto foi paralelizado pela quantidade de A β contida na fração de ácido fórmico (**Figura 16C**), demonstrando um efeito predominante deste variante específico. Apenas as espécies A $\beta_{40/42}$ solúveis de TBS mostraram uma tendência a serem inferiores ou superiores quando AAV4-APOE2 ou AAV4-APOE4, respectivamente, foi expresso por 2 meses (dados não mostrados).

[00169] Para determinar se a presença de isoformas de ApoE humanas pode refletir uma mudança inicial no grau de fibrilização de A β , a relação entre o imunotintimento resistente para A β utilizando Bam10 (que etiqueta todos os depósitos amiloides) e Thio-S (que tinge apenas o núcleo denso) também foi medida 2 meses após a injeção. Nenhuma mudança foi detectada entre as 3 isoformas, sugerindo que não havia nenhum efeito diferencial na distribuição das populações densas e difusas dos depósitos amiloides através dos grupos experimentais neste intervalo de tempo (**Figura 16B**). Estes dados indicam que uma exposição mais longa aos variantes de ApoE tem efeitos mais fortes sobre a deposição amiloide do que uma exposição mais curta.

[00170] Foi sugerido que a ApoE desempenha um papel no transporte de A β através da barreira hematoencefálica. Para testar se a exposição às isoformas de ApoE poderia modular o efluxo de

peptídeos A β através da barreira hematoencefálica, a concentração de A β_{40} foi medida no plasma de cada animal injetado. Foi observado que o conteúdo do plasma de A β tanto nos camundongos injetados intracerebroventricularmente com AAV4-APOE3 quanto nos camundongos injetados intracerebroventricularmente com AAV4-APOE4 era inferior em comparação a AAV4-APOE2 e AAV4-GFP (**Figura 10D**). Isto sugere que os variantes E3 e E4 ajudam a reter A β no compartimento do sistema nervoso central, consistentemente com as concentrações aumentadas relativas de A β no parênquima cerebral observado, e com os dados precedentes sugerindo uma vida média intensificada de A β devido a ApoE.

[00171] Os portadores de APOE4 são mais suscetíveis à disfunção neurovascular, e foi mostrado, recentemente, que o colapso da barreira hematoencefálica é favorecido nos camundongos APOE4 transgênicos, mesmo na ausência da deposição amiloide. A fim de avaliar se uma injeção intraventricular de um AAV4-APOE em APP/PS pode comprometer a integridade do BBB, um tingimento pós-morte com azul-da-prússia foi executado. Apesar da presença de poucas áreas focais positivas para hemossiderina espalhadas escassamente através do cérebro em todos os grupos, nenhuma diferença óbvia foi observada entre nenhum dos grupos de animais experimentais.

[00172] A expressão de isoformas de ApoE modula a cinética de progressão da amiloidose.

[00173] A ApoE4 foi associada com uma densidade aumentada de depósitos amiloideos, ao passo que o efeito oposto foi observado com a ApoE2 após 5 meses. Isto poderia refletir mudanças nas taxas de deposição ou depuração β amiloide ou ambos. Para avaliar como os variantes de ApoE afetam a progressão dinâmica da amiloidose, a geração de imagens de dois fôtons *in vivo* foi utilizada, seguida pela cinética de formação e depuração da chapa amiloide. Os

camundongos receberam uma injeção intraventricular com um vetor de AAV4 aos 7 meses de idade, e uma janela cranial foi implantada uma semana após a injeção, a fim de executar a primeira sessão de geração de imagens (T0). Após 1 mês (T1) e 2 meses (T2), os depósitos amiloides tiveram suas imagens tiradas nos mesmos campos de visão. Os camundongos foram eutanasiados para a análise pós-morte após a segunda sessão de geração de imagens.

[00174] A grande maioria dos depósitos amiloides permaneceu estável, embora novas chapas ocasionais pudessesem ser detectadas no pequeno volume de visualização durante o período de tempo de dois meses. Além disso, em rara ocasião, a imagem de uma chapa metóxi-positiva tirada no início do experimento não pôde ser detectada depois de um mês ou dois, sugerindo que algumas chapas poderiam ser depuradas. Com o tempo, foi observado um aumento total na densidade volumétrica dos depósitos amiloides, com a densidade em T2 em média 23% maior do que T1. A taxa de progressão amiloide foi mais rápida nos camundongos APP/PS1 tratados com ApoE4, ao passo que os animais expostos à ApoE2 tiveram uma densidade de depósito amiloide significativamente reduzida relativa a GFP (0,66), ApoE3 (0,67) e ApoE4 (0,74) após 2 meses (**Figuras 11A, 11B**). De um modo marcante, as mudanças de ApoE2 refletem uma diminuição da linha de base, mostrando, diretamente e pela primeira vez, uma depuração ativa mediada não imune das chapas. Em contraste aos dados obtidos dos animais transgênicos de APOE, estes resultados demonstram que a indução de um aumento modesto na quantidade de ApoE pode afetar o processo amiloidogênico em andamento mesmo depois de a deposição amiloide já ter começado.

[00175] Em seguida, o crescimento de chapa amiloide única foi avaliado ao medir a relação da área em seção transversal de depósitos individuais entre T1/T0 e T2/T1. Diferenças foram

detectadas entre grupos em T1 (relação T1/T0), mas não em T2 (relação T2/T1, **Figura 12**), sugerindo que a presença de variantes humanas de ApoE afeta principalmente o crescimento da chapa durante o primeiro mês após a exposição, mas este parâmetro não difere posteriormente. Particularmente, o tamanho dos depósitos amiloides cresceu significativamente mais nos camundongos tratados com ApoE4 em comparação à ApoE2 e ApoE3, sugerindo que não somente o número de chapas bem como seu tamanho foi exacerbado por este alelo. A ApoE4 afeta, portanto, a semeadura dos peptídeos A β bem como o tamanho das chapas preexistentes.

[00176] A densidade sináptica em torno dos depósitos amiloides é piorada pelas isoformas ApoE3 e ApoE4 em comparação a ApoE2.

[00177] A perda de sinapse é um parâmetro que se correlaciona melhor com o dano cognitivo. Recentemente, foi mostrado que a presença de ApoE4 está associada com níveis mais elevados de A β oligomérico sináptico nos cérebros de pacientes humanos com MA e conduz à densidade da sinapse significativamente diminuída em torno das chapas amiloides comparadas a ApoE3 (R. M. Koffie *et al.*, Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid-beta. *Brain* **135**, 2155 (julho de 2012); T. Hashimoto *et al.*, Apolipoprotein E, Especially Apolipoprotein E4, Increases the Oligomerization of Amyloid beta Peptide. *J Neurosci* **32**, 15181 (24 de outubro de 2012)). Além disso, recente evidência *in vitro* demonstrou que a ApoE4 não protegeu contra a perda de sinapse induzida por A β (M. Buttini *et al.*, Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and superexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci* **22**, 10539 (15 de dezembro de 2002); A. Sen, D. L. Alkon, T. J. Nelson, Apolipoprotein E3 (ApoE3) but not ApoE4 protects against synaptic loss through

increased expression of protein kinase C epsilon. *J Biol Chem* **287**, 15947 (4 de maio de 2012)). Há, portanto, a hipótese que uma distribuição contínua e difusa de cada isoforma de ApoE possa não somente afetar diferencialmente a cinética de deposição e depuração de A β no cérebro de camundongos APP/PS, mas também a integridade das sinapses que cercam os depósitos amiloides.

[00178] As densidades de elementos pré- e pós-sinápticos (respectivamente, sinapsina-1 e PSD95) foram determinadas utilizando a tomografia de arranjo, uma técnica de alta resolução baseada no tingimento por imunofluorescência de seções ultrafinas de tecido (K. D. Micheva, S. J. Smith, Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron* **55**, 25 (5 de julho de 2007); R. M. Koffie *et al.*, Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 4012 (10 de março de 2009)). Uma vez que foi mostrado que as espécies oligoméricas amiloides se concentram altamente em vizinhança próxima dos depósitos amiloides, puncta de sinapsina-1 e PSD95 foram quantificadas para longe ($> 50 \mu\text{m}$) ou perto ($< 50 \mu\text{m}$) das placas, utilizando os protocolos previamente estabelecidos (R. M. Koffie *et al.*, Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 4012 (10 de março de 2009)). Foi observado que a perda de elementos pre-sinápticos perto das chapas foi exacerbada quando APOE3 ou APOE4 foi expressa, o que não era o caso após a injeção de AAV4-APOE2 ou de AAV4-GFP (**Figura 13A**). Em contraste, a densidade de puncta pós-sináptica permaneceu inalterada entre os camundongos injetados com GFP, ApoE2 e ApoE3, ao passo que os animais tratados com ApoE4 mostraram uma perda significativa de PSD95 em torno dos depósitos

amiloïdes, reforçando desse modo o efeito deletério de ApoE4 sobre os efeitos neurotóxicos de A β (**Figura 13C**). Quando a densidade dos elementos sinápticos foi avaliada nas áreas situadas longe dos depósitos amiloïdes (> 50 μm), nenhuma diferença pôde ser detectado entre os grupos, sugerindo que não havia nenhum efeito dos variantes de ApoE humanos em si sobre a densidade sináptica, mas um efeito importante das isoformas de ApoE sobre a β neurotoxicidade induzida por A β . A perda sináptica relativa observada com ApoE3 e ApoE4 está diretamente relacionada, portanto, à presença dos peptídeos A β que cercam cada chapa (a uma distância < 50 μm de sua borda).

[00179] Como um parâmetro neuropatológico adicional, também foi avaliado o número de distrofias neuríticas associadas com os depósitos amiloïdes nos camundongos injetados com APP/PS1 AAV4. Além de uma densidade da espinha diminuída em torno deles, as chapas senis também causam uma alteração mais geral da neuropila com um aumento da curvatura do neurito e da aparência das distrofias intumescidas. Estas mudanças patológicas são provavelmente atribuíveis às espécies A β oligoméricas solúveis que são enriquecidas em uma região dentro de 50 μm da superfície da chapa. Foi observado que a superexpressão de ApoE4 exacerba a formação das distrofias neuríticas SMI312-positivas associadas com os depósitos amiloïdes em comparação a GFP, ApoE2 e ApoE3 (**Figura 13C**). Este resultado confirma a observação que a isoforma ApoE4 tem o efeito mais forte e modula não somente a formação da chapa mas afeta também a neurotoxicidade amiloide associada.

[00180] As proteínas de ApoE humana modificam a quantidade das espécies A β oligoméricas contidas no fluido intersticial em outro modelo de camundongo do MA.

[00181] Será abordada a seguir a questão se a presença de diferentes isoformas de ApoE dentro do ISF pode alterar a quantidade

da espécie amiloide solúvel nesse mesmo compartimento extracelular. Escolheu-se injetar outro modelo do MA, os camundongos Tg2576, a fim de validar as verificações precedentes em uma linhagem de camundongo transgênica diferente. Os camundongos Tg2576 superexpressam a forma mutacionada de APP que contém a mutação sueca e apresentam um fenótipo muito mais suave do que os camundongos APP/PS1 em uma dada idade. Foram injetadas coortes de animais com 16 a 18 meses de idade, de modo que os depósitos amiloides já estivessem presentes quando da transdução de AAV4-APOE. Três meses após a transferência genética, uma sonda de microdiálise foi introduzida no hipocampo, e as amostras foram coletadas para caracterizar as mudanças iniciais associadas com cada variante de APOE dentro do ISF.

[00182] Foi observado que a concentração das espécies oligoméricas de A β medidas utilizando o ensaio específico de ELISA 82E1/82E1 foi significativamente mais elevada (em $42 \pm 7\%$) após a injeção com AAV4-APOE4 em comparação a AAV4-APOE2 (**Figura 14**), sugerindo que a presença de ApoE pode modular a natureza dos agregados amiloides neste compartimento extracelular. Além disso, quando A β_{40} e A β_{42} totais foram avaliados no ISF, as mesmas tendências foram observadas, mas não atingiram significância (**Figura 17A**), sugerindo que a presença de diferentes isoformas de ApoE no ISF influencia o estado de agregação dos peptídeos amiloides um tanto mais do que a quantidade total.

[00183] Tal como previsto, as análises bioquímicas pós-morte dos cérebros dos camundongos Tg2576 expostos a várias isoformas de ApoE mostrou que a concentração de A β_{42} na fração de ácido fórmico foi significativamente aumentada nos animais tratados com ApoE4 (**Figura 17B**), confirmando estas observações em um segundo modelo transgênico nos camundongos APP/PS1.

[00184] Tomadas conjuntamente, estas medidas bioquímicas sugerem que a expressão de ApoE nos camundongos Tg2576 induz mudanças similares na biologia amiloide, como observada nos camundongos APP/PS1. De um modo marcante, uma mudança inicial é observada no teor de oA β dentro do ISF, onde estas espécies neurotóxicas podem diretamente interagir com os terminais sinápticos.

DISCUSSÃO

[00185] A conexão entre a herança dos alelos de APOE4 que aumentam o risco, e dos alelos de APOE2 que têm um efeito drasticamente oposto para o desenvolvimento do MA conduziu a múltiplas sugestões a respeito de como este risco é mediado. A ApoE foi implicada como uma proteína de ligação A β envolvida na depuração de A β . No entanto, os estudos em camundongos de *knockout* de apoE relataram, surpreendentemente, que os depósitos A β foram substancialmente mais baixos na ausência de apoE. A substituição por APOE2, APOE3 ou APOE4 humana conduziu a um aumento nos depósitos amiloides na mesma ordem que nos pacientes com MA, que foi postulada para ocorrer através de um efeito na iniciação da chapa ou na formação de fibrila. Hipóteses alternativas focalizam os efeitos diferenciais sobre o crescimento neurítico ou propõem ainda que o efeito do genótipo de APOE sobre o fenótipo do mal de Alzheimer é uma consequência de outro gene em desequilíbrio genético com a APOE no cromossomo 19.

[00186] Os presentes dados, derivados de um estudo de 2 modelos diferentes de camundongos utilizando uma abordagem previamente testada no ajuste da doença de armazenagem lisossomal e da doença de Huntington, abordaram diretamente estas questões, utilizando uma combinação de geração de imagens de multifótons *in vivo*, imuno-histopatologia quantitativa padrão, estudos de tomografia de arranjo da estrutura sináptica e novas abordagens de microdiálise de elevado

peso molecular que permitem o exame dos A β oligoméricos. Foi mostrado que a mudança do microambiente da ApoE no ISF nos animais com doença estabelecida tem efeitos específicos de alelo notáveis e rápidos sobre a economia de A β . O presente estudo demonstrou que mesmo um aumento modesto (de ~10%) nos níveis de ApoE4 aplicados ao ISF impacta de modo marcante o fenótipo A β e a cinética de depuração, com retenção associada a ApoE4 de A β solúvel aumentado, bem como as formas fibrilares e extraíveis de ácido fórmico, e aumenta a neurotoxicidade em torno das chapas marcadas pela perda sináptica e pelo aumento das distrofias neuríticas. Por outro lado, a apoE2 diminui o A β e tem um efeito neuroprotetor acentuado.

[00187] Uma vez que mudanças modestas nos níveis da ApoE no ISF têm tais consequências dramáticas, estes resultados podem conduzir a um *insight* sobre os efeitos de uma ampla variedade de fatores ambientais e genéticos que poderiam alterar o risco para o MA ou a progressão do MA ao influenciar a expressão de APOE. Os aumentos em ApoE de substancialmente mais do que a magnitude demonstrada podem ocorrer após trauma, epilepsia, isquemia e dietas de colesterol elevado, que foram associados com A β cerebral elevado. Além disso, polimorfismos do promotor que haviam sido previamente verificados como estando em desequilíbrio genético com o alelo APOE4 impactam a expressão de APOE.

[00188] Outras manipulações que impactam a homeostase de ApoE ou das lipoproteínas de ApoE no SNC claramente alteram a deposição de A β . Por exemplo, nos experimentos com transferência genética focal com lentivírus de APOE (principalmente nos neurônios hipocampais), a superexpressão de APOE4 exerce um efeito mais forte no amiloide relativa a APOE3. Estudos precedentes também mostraram que os agonistas de RXR, que têm múltiplos efeitos

incluindo a intensificação da síntese de apoE endógena, conduzem à depuração de A β do cérebro, talvez por um efeito sobre a depuração através da barreira hematoencefálica. Além disso, a transdução cerebral de CYP46A, que metaboliza o colesterol no SNC e abaixa seus níveis, reduz a deposição de A β assim como faz aumentar o LDL-R no cérebro, o que se sabe diminuir os níveis de apoE. Finalmente, as manipulações genéticas sugerem que a mudança na expressão de apoE pela metade pode impactar o fenótipo A β . Os presentes resultados sugerem, interessantemente, que mudanças mais modestas também podem ter efeitos drásticos.

[00189] Os presentes dados abordam diretamente outras quatro áreas importantes de controvérsia na literatura de APOE-Alzheimer. 1) Foi demonstrado um claro efeito da isoforma de ApoE sobre a neurotoxicidade avaliada pela perda de sinapse e pelas distrofias neuríticas, ambas provavelmente relacionadas aos danos da função do sistema neuronal. Já que estes efeitos eram evidentes na vizinhança imediata das chapas, mas não nas áreas distantes das chapas, a natureza protetora da sinapse de ApoE2 comparada a ApoE4 é provavelmente mediada por efeitos sobre a peri-chapa de A β em vez de isto se dar por um efeito direto de ApoE sobre a estabilidade sináptica. 2) Observação direta da cinética de deposição e crescimento de chapa utilizando a geração de imagens de multifôtons longitudinais *in vivo* mostra que a ApoE4 intensifica a deposição e o crescimento da chapa, ao passo que a ApoE2 é na verdade associada com a resolução das chapas – debatendo que as isoformas de ApoE têm um impacto poderoso sobre o ritmo e a progressão da doença além de um efeito inicial sobre a formação de chapa fibrilar. Os resultados reforçam a ideia que a ApoE4 pode acelerar o processo da doença em termos de deposição amiloide e neurotoxicidade (e conduz, desse modo, a uma idade de início mais precoce) sendo que

a ApoE2 faz o oposto, o que levanta a possibilidade que a introdução de ApoE2 (ou de uma ApoE2 mimética) no SNC poderia ter um valor terapêutico mesmo depois que a doença está bem estabelecida. 3) Sugeriu-se que a ApoE seria como um mecanismo para depurar A β do cérebro ou como uma molécula de retenção que aumenta a vida média de depuração; os presentes presentes resultados mostram que a introdução de quantidades modestas de ApoE no ISF é suficiente para intensificar a retenção de A β no SNC, a menos que seja ApoE2. 4) Os mecanismos de ação protetora notáveis das APOE2s no MA foram por muito tempo obscuros, em parte porque a ApoE2 se liga aos receptores de ApoE de maneira relativamente fraca. Os presentes dados sugerem que a ApoE2 tem um ganho de função – que pode realmente inverter os depósitos A β estabelecidos, bem como auxiliar a plasticidade sináptica e neurítica – além de um efeito provavelmente neutro ou nulo na depuração de A β no plasma. Isto sugere que a diferença em décadas na idade de início entre os pacientes que herdam os alelos de APOE4 e APOE2 pode refletir um ponto diferente de iniciação e diferenças contínuas na cinética de deposição e de depuração de A β , bem como diferenças específicas do alelo na extensão da neurotoxicidade associada com os depósitos. Esta dupla função de ApoE2 pode conduzir a abordagens terapêuticas que objetivam a simulação da capacidade de depuração de chapa e restauração sináptica.

[00190] Estes resultados são consistentes com um modelo em que a apoE age como uma estrutura de suporte para a oligomerização de A β , com eficiência na formação e estabilização de ApoE4>ApoE3>ApoE2 de A β oligomérico e, com a recente observação que o A β oligomérico é elevado no SNC dos pacientes com AD humanos de ApoE4 > ApoE3 (mesmo quando o fardo da chapa é normalizado através dos casos). Se ApoE, especialmente ApoE4, mediam a formação de A β

oligomérico neurotóxico, foi preao passo que a ApoE4 intensificada conduziria a alterações sinápticas e neuríticas aumentadas, como parece ser o caso nos presentes dados. Com base nestes resultados, deve-se ter cuidado no que diz respeito aos agentes que aumentariam níveis de ApoE no cérebro nos pacientes com MA que herdaram o alelo APOE4.

[00191] Finalmente, os presentes dados confirmam o poder da transdução mediada por AAV do epêndima para aplicar as proteínas secretadas ao cérebro e aqui, ao manto cortical inteiro. A transferência genética ou outras abordagens que diminuem a apoE4 ou aumentam a apoE2 são dispositivos poderosos para impactar a progressão da doença do MA.

MATERIAIS E MÉTODOS

[00192] **Animais.** Os experimentos foram executados utilizando ambos os camundongos transgênicos duplos (APP/PS1) APPswe/PS1dE9 (D. R. Borchelt *et al.*, Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* **19**, 939 (outubro de 1997)) (obtidos junto à Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) and Tg2576 mice (K. Hsiao *et al.*, Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* **274**, 99 (4 de outubro de 1996)). Um gene da proteína do precursor amiloide mutante humano que contém a mutação dupla sueca K594N/M595L foi introduzido no genoma destas duas linhagens de camundongos, sob controle do promotor da proteína do prón. Além disso, o modelo de camundongo APP/PS1 superexpressa um variante do gene de Presenilina 1 suprimido para o éxon 9 (dirigido pelo mesmo promotor). A superexpressão concomitante de APPswe e PSEN1 nos camundongos APP/PS1 conduz a um fenótipo mais grave, com uma deposição amiloide substancial visível a partir dos 6 meses de idade.

Por outro lado, a linhagem de camundongo Tg2576 é um modelo muito mais suave que apenas desenvolve chapas amiloides ao redor de um ano de idade. Para determinar se a introdução de isoformas diferentes de ApoE afetaria a progressão da doença, camundongos APP/PS1 com, respectivamente, 7 meses e 16 meses de idade (entre 4 e 7 animais por condição) e Tg2576 (entre 3 a 5 animais por condição) receberam injeção. Os camundongos deficientes em APOE (ApoE-KO, the Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) também foram utilizados. Os experimentos foram executados de acordo com NIH e as diretrizes institucionais.

Construção e produção de vetores virais

[00193] cDNA de APOE-2, -3 e -4 foi generosamente provido pelo Dr. LaDu na Universidade de Illinois (Chicago). Após a amplificação pela PCR, cada um deles foi digerido por BamHI e introduzido em uma cadeia principal de AAV2-pCMV-hrGFP. Os títulos elevados dos vetores do serótipo 4 de AAV (AAV4-APOE2, AAV4-APOE3, AAV4-APOE4 e AAV4-GFP) foram produzidos utilizando o sistema de baculovírus pelo Núcleo do Vetor de Transferência Genética na Universidade de Iowa, Iowa. Os vírus foram titulados utilizando a PCR quantitativa.

[00194] **Injeções Intraventriculares Estereotáticas.** Injeções intraventriculares estereotáticas de vetores do serótipo 4 de AAV foram executadas como descrito previamente (T. L. Spires *et al.*, dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* **25**, 7278 (3 de agosto de 2005); G. Liu, I. H. Martins, J. A. Chiorini, B. L. Davidson, Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. *Gene Ther* **12**, 1503 (outubro de 2005)). Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de quetamina/xilazina

(100mg/kg e 50mg/kg de peso corpóreo, respectivamente) e posicionados em uma estrutura estereotática (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). As injeções dos vetores foram executadas em cada ventrículo lateral com 5 µl do preparado viral (título de 2×10^{12} vg/mL) utilizando uma micropipeta bem definida de 33 calibres unida a uma seringa Hamilton de 10 µl (Hamilton Medical, Reno, NV) a uma taxa de 0,25 µl/minuto. As coordenadas estereotáticas de sítios de injeção foram calculadas a partir da bregma (anteroposterior +0,3 mm, mediolateral ± 1mm e dorsoventral -2mm).

[00195] **Implante da janela cranial e geração de imagens de multifótons.** Uma semana após a injeção intraventricular, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (1,5%) e uma janela cranial foi implantada ao remover uma parte do crânio e substituir por uma lamínula de vidro com 8 mm de diâmetro (como descrito previamente, T. L. Spires *et al.*, Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci* **25**, 7278 (3 de agosto de 2005)). Para a geração de imagens, um anel de cera foi construído ao longo da beira da janela para criar uma cavidade de água para o objetivo (uma abertura objetiva e numérica 20 de 0,95, Olympus). A fim de visualizar os depósitos amiloides, os animais transgênicos receberam uma injeção intraperitoneal de metóxi-XO₄ (5mg/kg) 24h antes da cirurgia, um composto fluorescente que cruza a barreira hematoencefálica e se liga aos depósitos amiloides (B. J. Bacska, W. E. Klunk, C. A. Mathis, B. T. Hyman, Imaging amyloid-beta deposits in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1035 (setembro de 2002)). Antes da geração das imagens, Texas Red dextran (70.000 Da de peso molecular; 12,5 mg/mL em PBS estéril; Molecular Probes, Eugene, OR) foi injetado em uma veia lateral da cauda para prover um angiograma fluorescente, de modo que o formato da vasculatura fosse

utilizada como um marco para seguir exatamente os mesmos campos de visão com o tempo. Imagens foram tiradas dos camundongos uma semana após a injeção de AAV, a fim de avaliar o nível da linha de base de depósitos amiloïdes, então um e dois meses após a injeção.

[00196] Um laser de modo travado Ti:Sapphire (MaiTai, Spectra-Physics, Mountain View, CA) montado em um sistema de geração de imagens de multifótons (Bio-Rad 1024ES, Bio-Rad, Hercules, CA) gerou uma luz de excitação fluorescência de dois fótons de 860 nm. A luz emitida foi coletada através de um detector externo personalizado contendo três tubos de fotomultiplicador (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ), na faixa de 380–480, 500–540 e 560–650 nm. As imagens em duas cores foram tiradas para as chapas e a angiografia, simultaneamente. Imagens *in vivo* de baixa ampliação (615 x 615 µm; etapa z, 2 µm, profundidade, ~200 µm) foram tiradas e também de 6 a 8 campos de visão para cobrir uma área cortical grande.

[00197] **Processamento da imagem e análise.** A densidade da chapa em cada campo de visão foi quantificada utilizando Image J ao relatar o número total de depósitos amiloïdes por volume de córtex com imagem. Considera-se o volume cortical que se inicia da primeira fatia da pilha z na superfície à última fatia, onde um depósito amiloïde poderia ser detectado. O tamanho dos depósitos amiloïdes foi avaliado com o tempo ao medir sua área em seção transversal a partir da intensidade máxima após projeção bidimensional. Para cada chapa, a relação da área entre o ponto de tempo inicial e o primeiro mês (T1/T0) ou entre o segundo e o primeiro mês (T2/T1) foi calculada.

[00198] Os ajustes do microscópio de multifótons (energia a laser e PMTs) foram mantidos inalterados durante todas as sessões diferentes de geração de imagens em todo o tempo de experimento.

[00199] **Amostragem de microdiálise *in vivo*.** A amostragem de microdiálise *in vivo* de Aβ intersticial cerebral e de ApoE foi executada

nos camundongos Tg2576, 3 meses após a injeção intracerebroventricular de cada AAV4 (S. Takeda *et al.*, Novel microdialysis method to assess neuropeptides and large molecules in free-moving mouse. *Neuroscience* **186**, 110 (14 de julho de 2011)). A sonda de microdiálise tinha um eixo de 4 mm com uma membrana (PEP-4-03, Eicom, Quioto, Japão) de polietileno (PE) de corte de 3,0 mm e 1.000 kDa de peso molecular (MWCO). Antes do uso, a sonda foi condicionada ao mergulhar brevemente em etanol, e foi então lavada com o tampão de perfusão do fluido cerebroespinal artificial (aCSF) (em mM: 122 NaCl, 1,3 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 3,0 KH₂PO₄, 25,0 NaHCO₃), que foi filtrado através de uma membrana com tamanho de poro de 0,2 µm. A saída e a entrada pré-condicionadas da sonda foram conectadas a uma bomba peristáltica (ERP-10, Eicom, Quioto, Japão) e a uma bomba de microsseringa (ESP-32, Eicom, Quioto, Japão), respectivamente, utilizando uma tubulação de etileno-propileno fluoretado (FEP) (φ 250 µm i.d.).

[00200] O implante da sonda foi executado como descrito previamente (S. Takeda *et al.*, Novel microdialysis method to assess neuropeptides and large molecules in free-moving mouse. *Neuroscience* **186**, 110 (14 de julho de 2011; J. R. Cirrito *et al.*, In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J Neurosci* **23**, 8844 (1º de outubro de 2003)), com ligeiras modificações. Resumidamente, os animais anestesiados (1,5% de isoflurano) foram estereotaticamente implantados com uma cânula guia (PEG-4, Eicom, Quioto, Japão) no hipocampo (bregma -3,1 mm, de lateral a linha mediana -2,5 mm, ventral a dura -1,2 mm). A guia foi então fixada ao crânio utilizando cimento dentário binário.

[00201] Quatro dias após o implante da cânula guia, os camundongos foram colocados em uma gaiola de microdiálise padrão

e uma sonda foi introduzida através da guia. Após a inserção da sonda, a fim de obter gravações estáveis, a sonda e os tubos de conexão foram perfusados com aCSF por 240 minutos a uma vazão de 10 µl/min antes da coleta da amostra. As amostras foram coletadas a uma vazão de 0,25 (para a quantificação de A β) e 0,1 µ l/min (para a detecção de ApoE). As amostras foram armazenadas a 4°C em tubos de polipropileno. Durante a coleta da amostra de microdiálise, os camundongos foram acordados e se moveram livremente na gaiola de microdiálise projetada para permitir movimento irrestrito dos animais sem aplicar pressão sobre o conjunto da sonda (sistema de microdiálise AtmosLM, Eicom, Quioto, Japão).

[00202] **Análise Imuno-histológica.** Os camundongos APP/PS1 foram eutanasiados por inalação de CO₂ 2 ou 5 meses após a injeção intraventricular (exposição de curto e longo prazo), ao passo que os animais Tg2576 foram sacrificados após 3 meses. Um hemisfério cerebral inteiro foi fixado em 4% de paraformaldeído em solução salina tamponada com fosfato para a análise imuno-histológica e incorporado em cera de parafina. Uma seção coronal de 1 mm através do córtex frontal foi processada para o ensaio de tomografia de arranjo, ao passo que o restante do mesencéfalo foi bruscamente congelado para executar as análises bioquímicas e biomoleculares.

[00203] Para detectar os depósitos amiloides, ApoE e GFP, as seções incorporadas em parafina (10 µm) foram sequencialmente desparafinadas em xileno, reidratadas em etanol, tratadas em tampão de citrato (10mM de citrato de sódio, 0,05% de Tween 20, pH 6,0), permeabilizadas em PBS com 0,5% de Triton e bloqueadas em PBS com 3% de BSA por 2 horas à temperatura ambiente. A incubação com os anticorpos primários foi feita até a manhã seguinte a 4°C:Bam10 (SIGMA 1:1000) e R1282 (1:500, provido pelo Dr. Dennis Selkoe) para as chapas amiloides, anticorpo monoclonal de

camundongo 3H1 (Instituto do Coração de Ottawa) para ApoE humana, anti-GFP de galinha (1:500, Aves) e SMI-312 (Covance) para as distrofias neuríticas. A incubação com o anticorpo secundário foi feita por 2 h à temperatura ambiente no dia seguinte. Chapas amiloides densas do núcleo foram etiquetadas pela incubação das fatias por 8 minutos em uma solução a 0,05% de Thio-S (Sigma, St Louis, MO) em 50% de etanol antes da montagem.

Preparação da amostra, imunotintimento e análise de imagem para a tomografia de arranjo

[00204] Análises de tomografia de arranjo para elementos pré- e pós-sinápticos foram executadas como descrito previamente (R. M. Koffie *et al.*, Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 4012 (10 de março de 2009)). Resumidamente, uma parte do tecido cortical (1 mm³) adjacente à região ventricular foi dissecada e fixada por 3h em 4% de paraformaldeído, 2,5% de sacarose em 0,01M de PBS. Após a desidratação em etanol, as amostras foram incubadas em resina LR White (Electron Microscopy Sciences) até a manhã seguinte a 4°C antes da polimerização a 53°C. As fitas de seções (70 nm) foram então cortadas em um micrótomo de ultracorte (Leica) utilizando uma Jumbo Histo Diamond Knife (Diatome).

[00205] Após a reidratação em 50 mM de glicina em TBS por 5 minutos, as seções foram bloqueadas em 0,05% de Tween e 0,1% de BSA em Tris por 5 minutos, e os anticorpos primários foram aplicados 1:50 no tampão de bloqueio por 2 horas (PSD95 Abcam Ab12093, sinapsina I Millipore AB1543 e NAB61 da Dra. Virginia Lee, que preferencialmente tinge as espécies Aβ oligoméricas, E. B. Lee *et al.*, Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody

improves learning and memory in Abeta precursor protein (APP) transgenic mice. *J Biol Chem* **281**, 4292 (17 de fevereiro de 2006)). As lâminas foram lavadas com TBS, e os anticorpos secundários foram aplicados (Alexa Fluor anticabra 488, anticomundongo Cy3 ou anticomundongo 488 da Invitrogen). As imagens foram obtidas em 7-30 seções em série através do córtex frontal e tiradas utilizando um microscópio confocal/de multifóttons Zeiss Axioplan LSM510 (objetivo Plan Apochromatic Oil com 63x de abertura numérica).

[00206] As imagens foram analisadas como previamente descrito utilizando Image J (software aberto da National Institutes of Health) e MATLAB (Mathworks) (R. M. Koffie *et al.*, Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 4012 (10 de março de 2009)). Cada conjunto de imagens foi convertido em pilhas e alinhado utilizando plug-ins Image J MultiStackReg e StackReg (cortesia de Brad Busse e P. Thevenaz, Universidade de Stanford). Os volumes conhecidos foram selecionados e um programa de detecção com base no limiar automatizado foi utilizado contar puncta de PSD95 e sinapsina que apareceram em mais de uma seção consecutiva (programa WaterShed, provido pela Brad Busse, Stephen Smith e Kristina Micheva, Universidade de Stanford). WaterShed exportou uma pilha de imagem de limite (separada para cada canal) que mostra as puncta que estavam presentes em mais de uma fatia do arranjo. Diversos sítios no córtex foram testados por camundongo, e sua distância da borda de uma chapa foi medida.

Quantificação de A β

[00207] As concentrações de A β_{40} e A β_{42} na fração solúvel de TBS, na fração de ácido fórmico bem como no microdialisado foram determinadas por ELISA sanduíche BNT-77/BA-27 (para A β_{40}) e BNT-77/BC-05 (para A β_{42}) (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japão),

de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de oligômero A β na amostra foi determinada por ELISA sanduíche de 82E1/82E1 (Immuno-Biological Laboratories, Inc, Hamburgo, Alemanha), em que os mesmos anticorpos de N-terminal (resíduos 1-16) foram utilizados para a captação e detecção (W. Xia *et al.*, A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66, 190 (fevereiro de 2009)).

Análise de Imunotransferência

[00208] As frações solúveis de TBS do cérebro e os microdialisados (20 μ g de proteína) foram eletroforizados em 4-12% de géis de Bis-Tris da Novex (Invitrogen) em tampão de execução de MOPS para SDS-PAGE (Invitrogen). Os géis foram transferidos à membrana de PVDF e bloqueados por 60 minutos à RT em 5% de leite/TBS-T. As membranas foram sondadas com o anticorpo anti-ApoE de cabra (1:1000, Millipore, AB947) para detectar um pouco de APOE no ISF de animais nulos em APOE, ao passo que a albumina foi detectada como um controle. Transferências para ApoE humana e de camundongo foram sondadas, respectivamente, com o anticorpo de EP137Y (1:1000, Novus Biologicals, NB110-55467) e com o anticorpo de apoE polyclonal de coelho (1:1000, Abcam, ab20874). A incubação com os anticorpos IgG de cabra conjugados a HRP (vetor) foi feita por 2 horas. As proteínas imunorreativas foram desenvolvidas utilizando um kit ECL (Western Lightning, PerkinElmer) e detectadas em Hyperfilm ECL (GE Healthcare).

qRT-PCR

[00209] O RNA total das amostras do cérebro foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies; 15596-026) e o cDNA foi então sintetizado de acordo com as instruções do fabricante de SuperScript® III One-Step RT-PCR System (Life Technologies; 12574-018). Os primers de PCR foram especificamente projetados para amplificar o

mRNA de APOE humana recombinante e os mRNAs de Apoe e Gapdh endógenos (Apoe Direto: 5'-AGCTCCCAAGTCACACAAGA; Apoe Reverso: 5'-GTTGCGTAGATCCTCCATGT; APOE Direto: 5'-CCAGCGACAATCACTGAAC; APOE Reverso: 5'-GCGCGTAATACGACTCACTA; Gapdh Direto: 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG e Gapdh Reverso: 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG).

ELISA DE APOE

[00210] Ensaios de ELISA específicos foram utilizados para detectar as proteínas de APOE de murinos humanas e endógenas. Em resumo, as placas de ELISA foram revestidas até a manhã seguinte com 1,5 µg/mL do anticorpo anti-APOE de cabra (para detectar a APOE de murino) ou 1,5 µg/mL do anticorpo de WUE4 (para detectar a APOE humana) e bloqueadas com leite desnatado a 1% diluído em PBS por 1,5 h a 37°C. As proteínas de apoE recombinantes humanas foram utilizadas como padrões (para o ensaio específico humano, Biovision) ou padrões de camundongo internos do extrato do cérebro (para o ensaio específico murino), e as amostras foram diluídas em tampão de ELISA (0,5% de BSA e 0,025% de Tween-20 em PBS) e incubadas até a manhã seguinte. Após a lavagem, os anticorpos de detecção específicos para humanos (Apoe de cabra; Millipore, 1:10,000) ou camundongos (Abcam ab20874; 1:2,000) foram utilizados, respectivamente, seguido pela incubação por 1,5 h com um secundário conjugado a HRP apropriado. A revelação do sinal foi feita utilizando o substrato de TMB antes de interromper a solução utilizando H₃PO₄. Os resultados colorimétricos foram medidos em 450nm.

Análises estatísticas

[00211] As análises estatísticas foram executadas ao utilizar o software Prism. Por causa do tamanho pequeno das amostras, a normalidade não poderia ser suposta para a maioria das análises.

Para toda a análise pós-morte, um teste Kruskal-Wallis não paramétrico seguido por um Teste de Comparação Múltipla da Dunn foi executado para avaliar o efeito de cada vetor injetado. A geração de imagens *in vivo* dos dados da progressão amiloide foi analisada ao utilizar um modelo de efeitos mistos, com um efeito aleatório para o camundongo e efeitos fixos para o vetor, o tempo e a densidade volumétrica da linha de base. Uma interação entre o tempo e o vetor foi considerada nesta análise, mas não era significativa. Para a análise do tamanho da chapa com o tempo, dois modelos de efeitos misturados foram ajustados para o registro da relação de dois pontos consecutivos no tempo, com os efeitos aleatórios para o camundongo e os efeitos fixados para o tamanho da linha de base do registro (t_0 na primeira análise, T_1 na segunda análise).

[00212] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente são aqui incorporados a título de referência. Embora, no relatório descritivo antecedente, a presente invenção tenha sido descrita com relação a determinadas modalidades preferidas da mesma e muitos detalhes tenham sido determinados para finalidades de ilustração, ficará evidente aos elementos versados na técnica que a invenção é passível à incorporação de modalidades adicionais e que determinados detalhes aqui descritos podem ser consideravelmente variados sem que se desvie dos princípios básicos da invenção.

[00213] O uso dos termos "um, uma" e "o, a, os, as" e referentes similares no contexto de descrição da invenção deve ser interpretado para abranger o singular e o plural, a menos que aqui indicado de outra maneira ou claramente contradito pelo contexto. Os termos "que comprehende", "que tem", "que inclui" e "que contém" devem ser interpretados como termos em aberto (isto é, significando "incluindo, mas não limitado a"), a menos que indicado de outra maneira. A citação de faixas de valores na presente invenção se presta

meramente a servir como um método de abreviação de referência individual a cada valor separado que se encontra dentro da faixa, a menos que esteja indicado de alguma outra maneira na presente invenção, e cada valor separado é incorporado no relatório descritivo como se fosse individualmente citado na presente invenção. Todos os métodos descritos na presente invenção podem ser executados em qualquer ordem apropriada, a menos que esteja indicado de alguma outra maneira na presente invenção ou claramente contradito de alguma outra maneira pelo contexto. O uso de todo e qualquer exemplo ou linguagem exemplificadora (por exemplo, "tal como") provido na presente invenção se presta meramente a explicar melhor a invenção e não impõe uma limitação ao âmbito da invenção, a menos que esteja reivindicado de alguma outra maneira. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando nenhum elemento não reivindicado como essencial à prática da invenção.

[00214] As modalidades da presente invenção são aqui descritas incluindo o melhor modo conhecido pelos autores da presente invenção para realizar a invenção. Variações dessas modalidades podem se tornar evidentes aos elementos versados na técnica quando da leitura da descrição acima. Os autores da presente invenção esperam que os elementos versados na técnica empreguem variações, tal como apropriado, e os autores da presente invenção pretendem que a invenção seja praticada de maneira diferente daquela especificamente descrita na presente invenção. Consequentemente, a presente invenção inclui todas as modificações e equivalentes do tema citado nas reivindicações em anexo, conforme permitido pela lei aplicável. Além disso, qualquer combinação dos elementos acima descritos em todas as variações possíveis é abrangida pela invenção, a menos que esteja indicado de alguma outra maneira na presente invenção ou claramente contradito de alguma outra maneira pelo contexto.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma partícula de rAAV2 compreendendo uma proteína de capsídeo de AAV2 e um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE ϵ 2 de proteção da proteína inserida entre um par de repetições terminais invertidas de AAV2, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para tratar doença de Alzheimer em um mamífero não roedor, em que a referida partícula de rAAV2 alveja uma célula ependimal do mamífero não roedor, entregando assim o ácido nucleico à célula ependimal, em que a célula ependimal secreta a isoforma ApoE ϵ 2 da proteína de modo a tratar a doença.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida partícula rAAV2 é administrada *ex-vivo* a uma célula ependimal do referido mamífero não roedor, e a célula ependimal é devolvida ao mamífero não roedor, entregando desse modo o ácido nucleico ao mamífero não roedor.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mamífero não roedor é um primata, um cavalo, um carneiro, uma cabra, um porco, ou um cão.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o mamífero não roedor é um cão.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o mamífero não roedor é um primata.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o primata é um ser humano.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que comprehende uma partícula de rAAV2 compreendendo uma proteína de capsídeo de AAV2 e um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE ϵ 2 de proteção da proteína inserida entre um par de repetições terminais invertidas de AAV2, para uso no

tratamento da doença de Alzheimer em um mamífero, em que a partícula de AAV2 é administrada a uma célula ependimal, em que a célula ependimal secreta a isoforma ApoE ϵ 2 da proteína de modo a tratar a doença, sendo que o mamífero é um mamífero não roedor.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o mamífero não roedor é um primata, um cavalo, um carneiro, uma cabra, um porco, ou um cão.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o mamífero não roedor é um cão.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o mamífero não roedor é um primata.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o primata é um ser humano.

12. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um composto da partícula de rAAV2 compreendendo uma proteína de capsídeo de AAV2 e um vetor compreendendo um ácido nucleico que codifica uma isoforma ApoE ϵ 2 de proteção da proteína inserida entre um par de repetições terminais invertidas de AAV2, um recipiente, e uma bula ou um rótulo com instruções de uso da partícula de AAV2 ao CSF para tratamento da doença de Alzheimer em um mamífero não roedor.

13. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, ou kit, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o referido vetor compreende ainda um elemento de controle de expressão, em que o referido elemento de controle direciona a transcrição ou expressão do referido ácido nucleico no referido mamífero não roedor *in vivo*.

FIG. 1

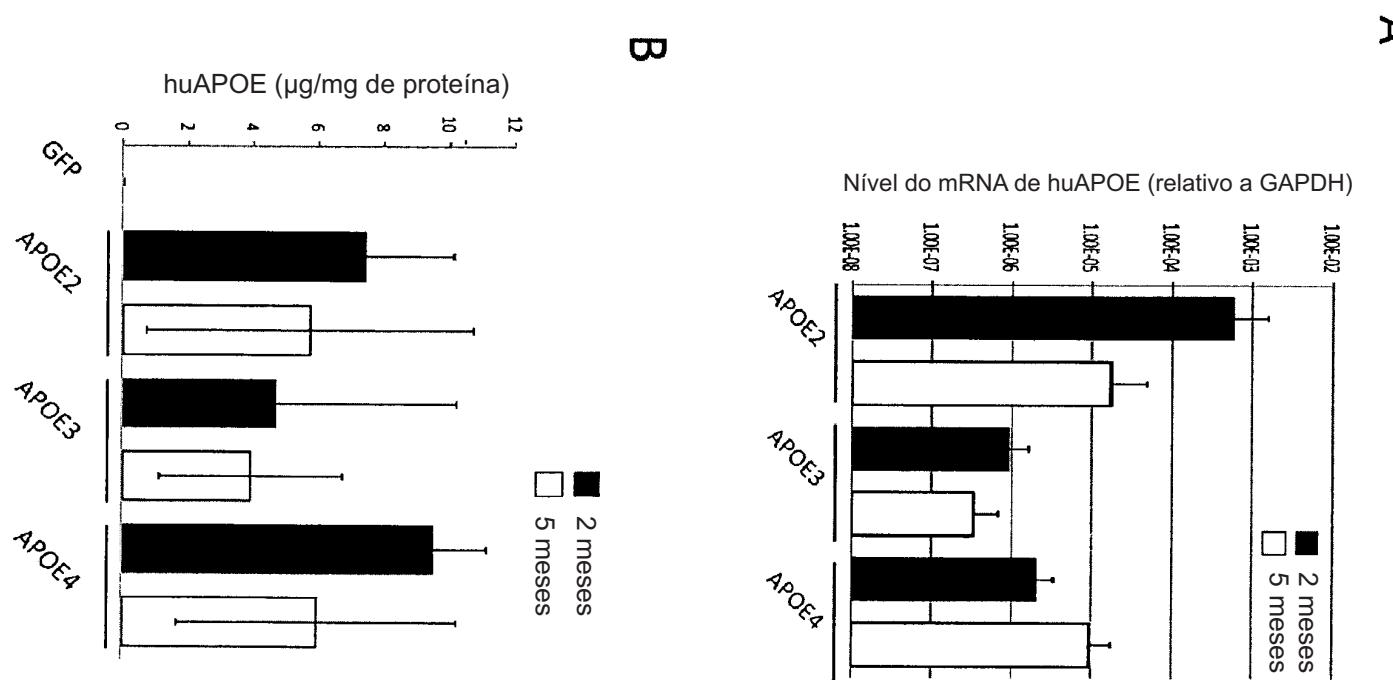


FIG. 2

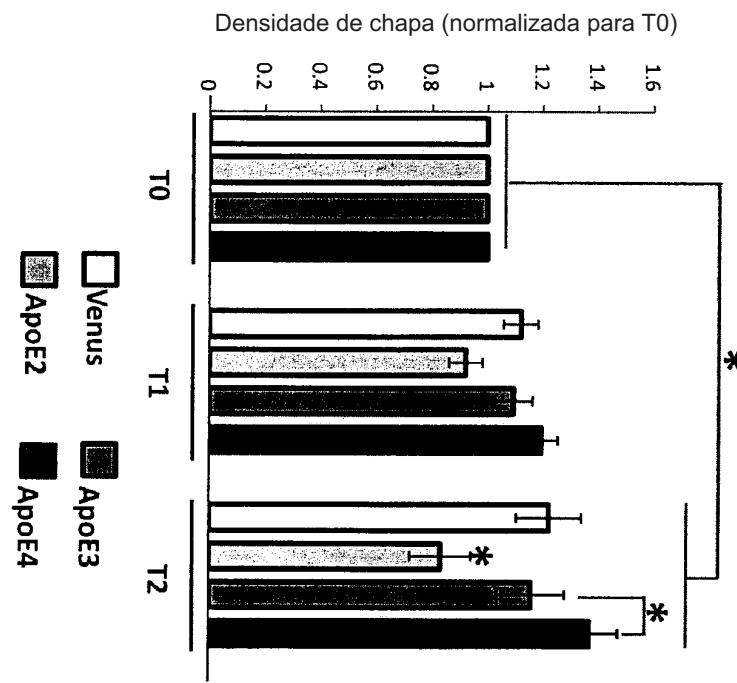


FIG. 3

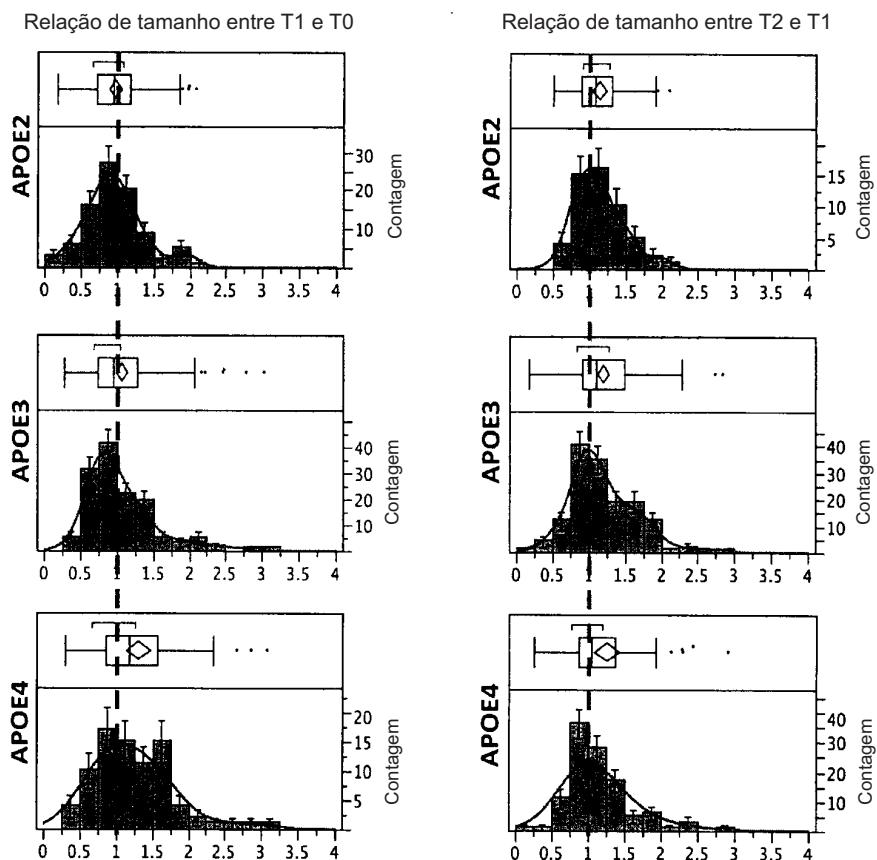


FIG. 4

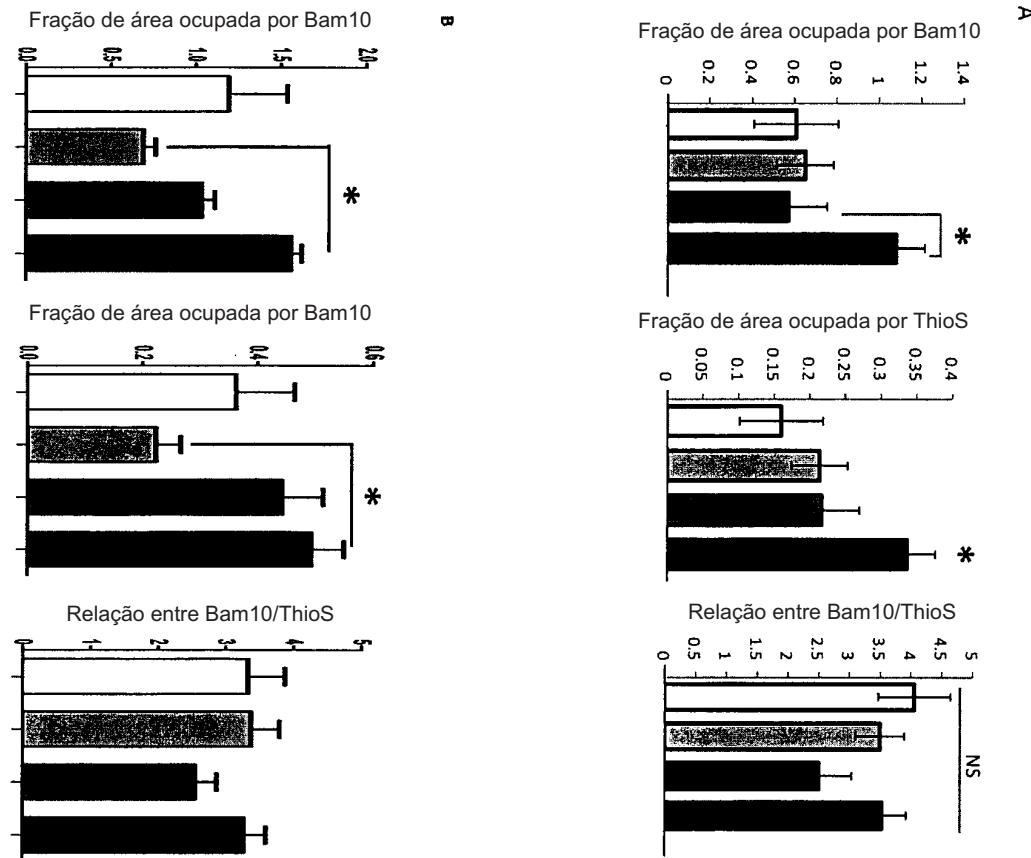


FIG. 5

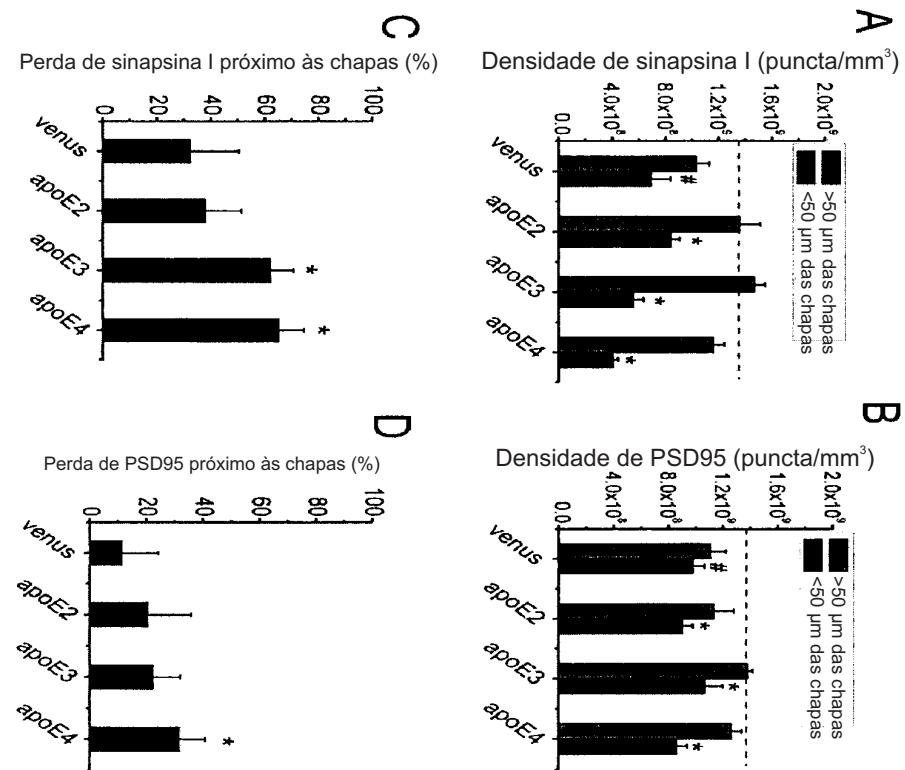


FIG. 6A-1

Alinhamento de Sequência Múltipla ClustalW (v1.83)

2 Sequências Alinhadas

Lacunas Inseridas = 7

Escore de alinhamento = nan

Identidades Conservadas = 446

Modo de Alinhamento Pareado: Devagar

Parâmetros de Alinhamento Pareado:

Abrir Penalidade para Lacunas = 10,0 Estender Penalidade para Lacunas = 0,1

Matriz de Similaridade: gonnet

Parâmetros de Alinhamento Múltiplo:

Abrir Penalidade para Lacunas = 10,0 Estender Penalidade para Lacunas = 0,1

Atraso divergente = 40%

Distância de Lacuna= 8

Matriz de Similaridade: gonnet

Tempo de Processamento: 0,2 segundos

6/27

AAV4capPro 1 -MTDGYLPDWLEDNLSEGVRREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLD 59

AAV2capPro 1 MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKGPPPPPKAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLD 60
*****.****.*.** * .** * ** ..*. * .***** ****

AAV4capPro 60 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQLKAGDNPYLKYNHADAEFQQLQGDTSFGNLGRAVFQ 119

AAV2capPro 61 KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGNLGRAVFQ 120
***** *****.** .*****.**. *****

AAV4capPro 120 AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQPDSSTGIGKKGKQPAKKLVFEDETGAG 179

AAV2capPro 121 AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDAD 180

FIG. 6A-2

FIG. 6A-3

** . * .. * . * . . * ***. ** * . * . . *

AAV4capPro 591 VDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTDGHFHPSPPLIGGFGLKHPPPQIFIKNT 650
AAV2capPro 592 TADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNT 651
... * ***** * . * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * .

AAV4capPro 651 PVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNYQQNSLL 710
AAV2capPro 652 PVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQtyTSNYNKSVD 711
*****.****.. *****.*****.***.***.*** *****.*****.*****.. .

AAV4capPro 711 WAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL 734
AAV2capPro 712 FTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL 735
. *. * * .*** *****..*

FIG. 6B-1

Alinhamento de Sequência Múltipla ClustalW (v1.83)

2 Sequências Alinhadas

Escore de alinhamento = nan

Lacunas Inseridas = 10

Identidades Conservadas = 1440

Modo de Alinhamento Pareado: Devagar

Parâmetros de Alinhamento Pareado:

Abrir Penalidade para Lacunas = 10,0 Estender Penalidade para Lacunas = 5,0

Parâmetros de Alinhamento Múltiplo:

Abrir Penalidade para Lacunas = 30,0 Estender Penalidade para Lacunas = 5,0

Atraso divergente = 40% Transições: Ponderadas

Tempo de Processamento: 1,8 segundos

9/27

1. AAV2capNuc vs. AAV4capNucl

Comprimento Alinhado = 2235 Lacunas = 10

Identidades = 1440 (65%)

AAV2capNuc	1	ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGA	60
AAV4capNucl	1	---ATGACTGACGGTTACCTTCCAGATTGGCTAGAGGACAACCTCTGAAGGCAGTCGA	57
		* *** ***** ***** * ***** * * *	
AAV2capNuc	61	CAGTGGTGGAAAGCTAAACCTGGCCCACCACCAAGCCCGAGAGCGGCATAAGGAC	120
AAV4capNucl	58	GAGTGGTGGCGCTGAAACCTGGAGCCCTAACCCAAAGGCAAATCAACAACATCAGGAC	117
		***** *** ***** * * *** * * * * * * *	

FIG. 6B-2

AAV2capNuc	121	GACAGCAGGGTCTTGTGTTCTGGTACAAGTACCTCGGACCCTAACGGACTCGAC	180
AAV4capNucl	118	AACGCTCGGGTCTTGTGTTCCGGTACAATACCTCGGACCCGGAACGGACTCGAC	177
	**	*****	*****
AAV2capNuc	181	AAGGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGCGCCCTCGAGCACGACAAGCCTACGAC	240
AAV4capNucl	178	AAGGGGAACCGTCAACGCAGCGGACGCGGAGCCCTCGAGCACGACAAGCCTACGAC	237
	*****	***	*****
AAV2capNuc	241	CGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTTT	300
AAV4capNucl	238	CAGCAGCTCAAGGCCGGTGACAACCCCTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGCCGAGTT	297
	*	*****	*****
AAV2capNuc	301	CAGGAGCGCCTAAAGAAGATACTGTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCAG	360
AAV4capNucl	298	CAGCAGCGCTTCAGGGGACACATCGTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCAG	357
	***	***	*****
AAV2capNuc	361	GCGAAAAAGAGGGTTCTGAACCTCTGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCG	420
AAV4capNucl	358	GCCAAAAAGAGGGTTCTGAACCTCTGGTCTGGTTGAGCAAGCGGGTGAGACGGCTCCT	417
	**	*****	*****
AAV2capNuc	421	GGAAAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCTGAGCCAGACTCCTCCACGGAACCGGA	480
AAV4capNucl	418	GGAAAGAAGAGACCGTTGATTGAATCCCCCAGCAGCCGACTCCTCACGGTATCGGC	477
	*****	***	***
AAV2capNuc	481	AAGGCGGCCAGCAGCTGCAAGAAAAGATTGAATTGGTCAAGCTGGAGACGCAGAC	540
AAV4capNucl	478	AAAAAAGGCAAGCAGCCGGCTAAAAGAAGCTCGTTTCGA-----AGACGAAACT	528
	**	***	*****

FIG. 6B-3

11/27

FIG. 6B-4

12/27

FIG. 6B-5

AAV2capNuc	1372	TCAA--GGCTTCAGTTCTCAGGCCGGAGCG-AGTGACATTGGGACCAGTCTAGGAAC	1428
AAV4capNucl	1354	ACTGCCACCACTTACCAAGCTGCCCTACCAACTTTCCAACTTAAAAAGAAC	1413
	*	*	***
AAV2capNuc	1429	TGGCTTCCTGGACCTGTTACGCCAGCAGCAGTGAGTATCAAAGACATCTGGATAACAC	1488
AAV4capNucl	1414	TGGCTGCCGGGCCTCAATCAAGCAGCAGGGCTCTCAAAGACTGCCAATAAAATAC	1473
	*****	***	***
AAV2capNuc	1489	AACAG---TGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA-----CCTCAAT	1533
AAV4capNucl	1474	AAGATCCCTGCCACCGGGTCAGACAGTCTCATCAAATACGAGAGACGCAGCACTCTGGAC	1533
	**	*	***
AAV2capNuc	1534	GGCAGAGACTCTGGTAATCCGGGCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAA	1593
AAV4capNucl	1534	GAAGATGGAGTGCCTGACCCCCGGACCTCCAATGGCACGGCTGGACCTGGGACAGC	1593
	***	*	***
AAV2capNuc	1594	AAGTTTTCTCAGAGCGGGTTCTCATCTTGGGAAGCAAGGCTAGAGAAAACAAT	1653
AAV4capNucl	1594	AAGTTCA---AACAGCCAGCTCATCTTGCAGGGCTAACAGAACGGCACACGGCC	1650
	*****	***	***
AAV2capNuc	1654	GTGGACATTGAAAAGGTATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCGTG	1713
AAV4capNucl	1651	ACCGTACCCGGACTCTGATCTCACCTTGAGGAGGAGCTGGCAGCCACCAACGCCACC	1710
	*	*	***
AAV2capNuc	1714	GCTACGGAGCACTGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCT	1773
AAV4capNucl	1711	GATACGGACATGTGGGCAACCTACCTGGCGGTGACCAGAGCAACAGAACCTGCCGACC	1770
	*****	**	***

13/27

FIG. 6B-6

AAV2capNuc	1774	ACCGCAGATGTCAACACACAAGGC TTCTCCAGGC ATGGT CTGGC AGGACAGAGATGTG	1833
AAV4capNucl	1771	GTGGACAGACTGACAGC TTGGAGCC GTGCCTGGAATGGT CTGGCAAAACAGAGACATT	1830
	*	* *	
AAV2capNuc	1834	TACCTTCAGGGGCCATCTGGCAAAGATTCCACACACGGACGGACATTTCACCCCTCT	1893
AAV4capNucl	1831	TACTACCAGGTCCCATTGGGCCAAGATTCTCATACCGATGGACACTTCACCCCTCA	1890
	*** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** ***		
AAV2capNuc	1894	CCCCTCATGGGTGGATTGGACTAAACACCCCTCCTCACAGATTCTCATCAAGAACACC	1953
AAV4capNucl	1891	CCGCTGATTGGTGGTTGGCTGAAACACCCGCTCCTCAAATTTTATCAAGAACACC	1950
	*** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** *** ***		
AAV2capNuc	1954	CCGGTACCTGCGAATCCTCGACCACCTTCAGTGC GGCAAAGTTGCTTCCTTCATCACA	2013
AAV4capNucl	1951	CCGGTACCTGCGAATCCTGCAACGACCTTCAGCTCTACTCCGGTAAACTCCTTCATTACT	2010
	***** *		
AAV2capNuc	2014	CAGTACTCCACGGGACAGGT CAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGC	2073
AAV4capNucl	2011	CAGTACAGCACTGCCAGGTGTCGGTGCAGATTGACTGGGAGATCCAGAAGGAGCGGTCC	2070
	***** *** *		
AAV2capNuc	2074	AAACGCTGGAATCCC GAAATT CAGTACACTCCA ACTACA ACAGTCTGTTAATGTGGAC	2133
AAV4capNucl	2071	AAACGCTGGAACCCCGAGGTCCAGTTACCTCCA ACTACGGACAGCAAAACTCTGTGTTG	2130
	***** *		
AAV2capNuc	2134	TTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATT CAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCA GATA CCTG	2193
AAV4capNucl	2131	TGGGCTCCGATGCGGCTGGGAAATACACTGAGCCTAGGGCTATCGGTACCCGCTACCTC	2190
	* *		

FIG. 6B-7

AAV2capNuc	2194	ACTCGTAATCTGTAA	2208
AAV4capNucl	2191	ACCCACCACCTGTAA	2205
	***	*	*****

FIG. 7

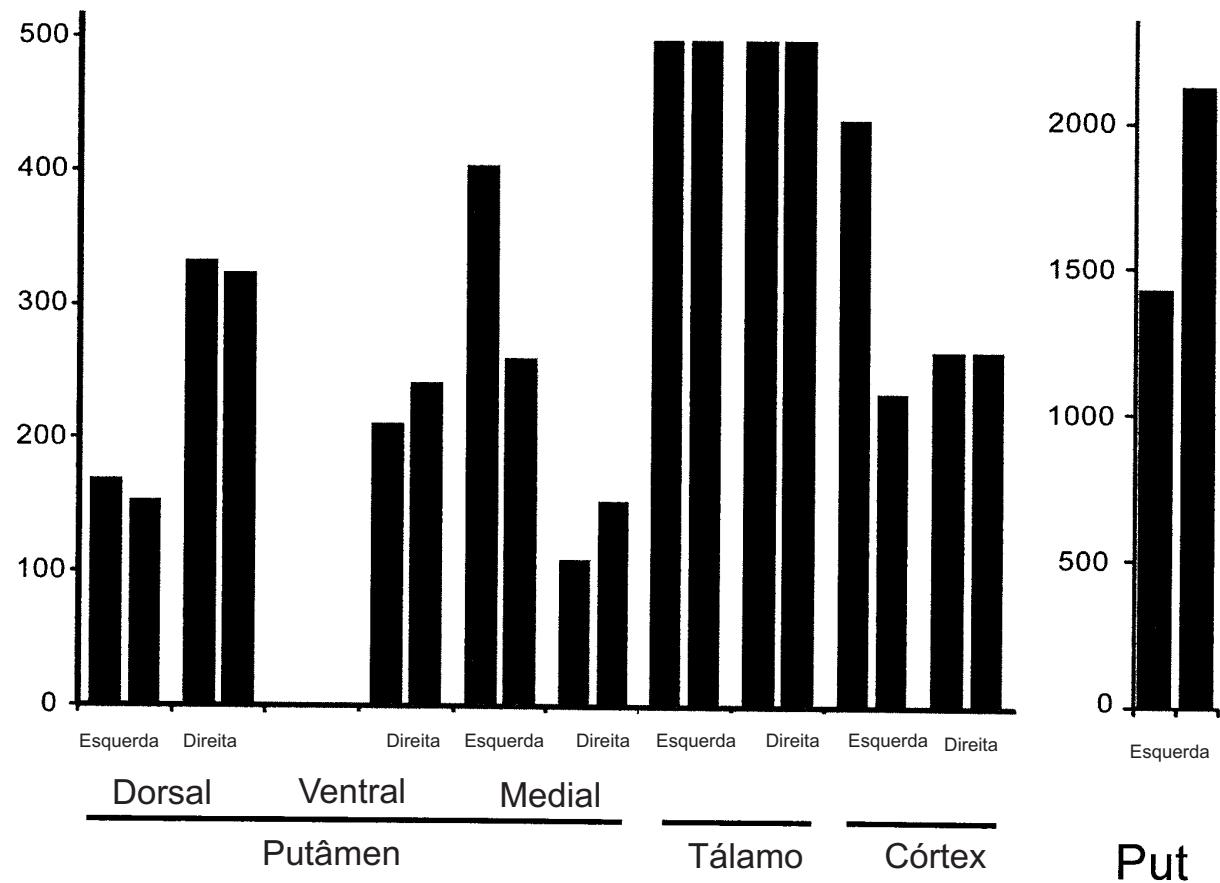


FIG. 8

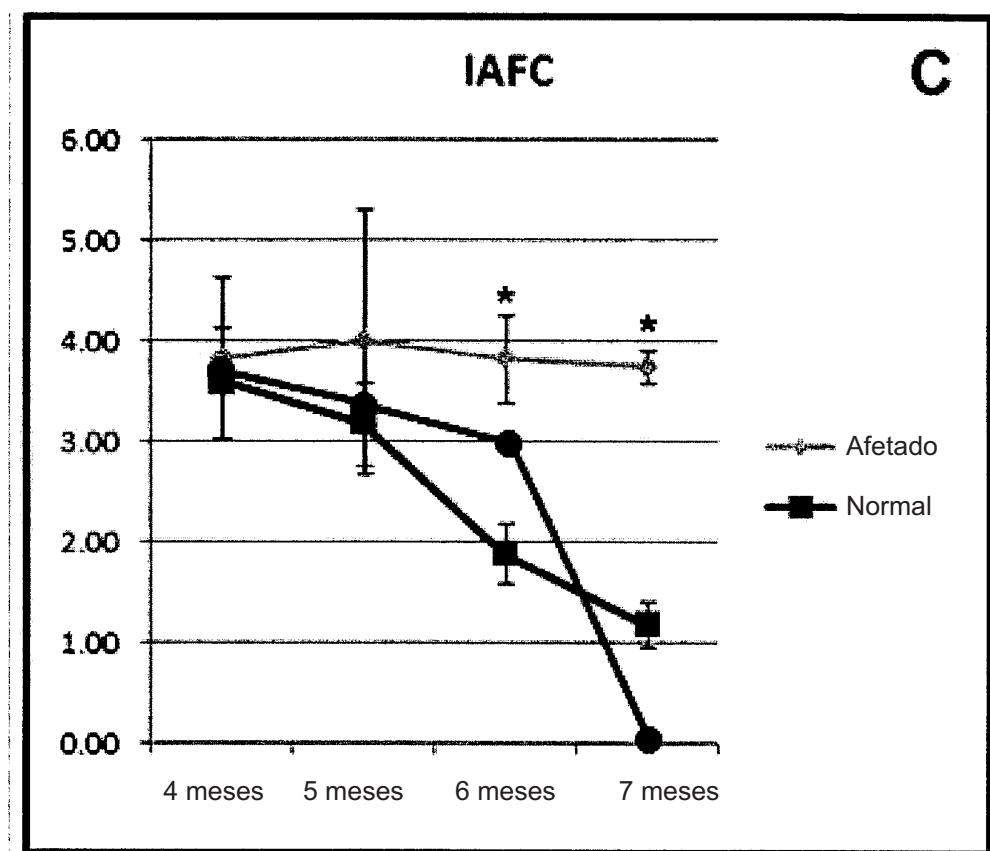


FIG. 9A

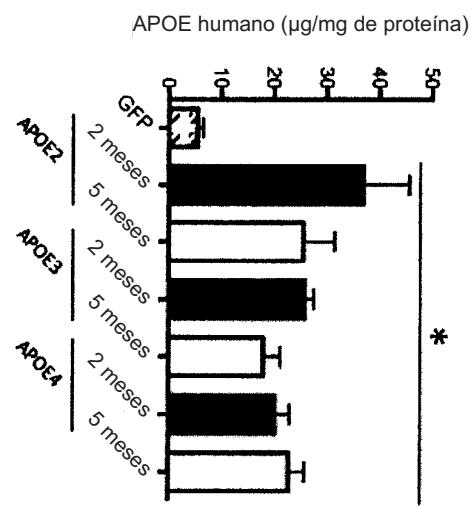


FIG. 9B

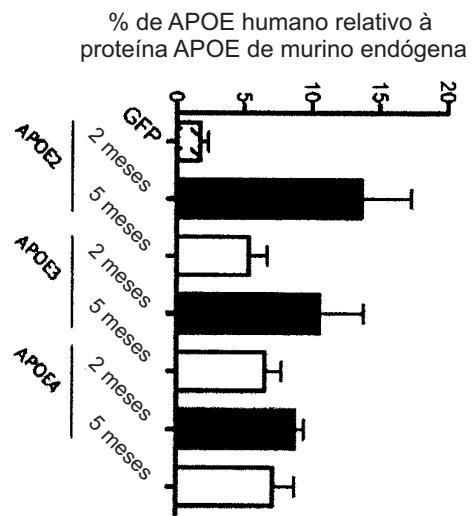


FIG. 10A

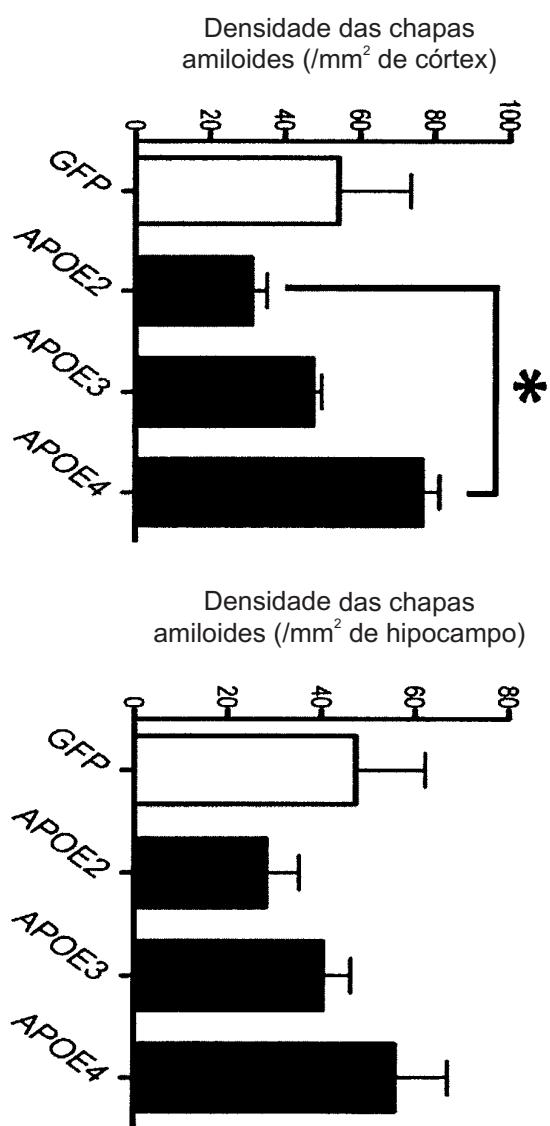


FIG. 10B

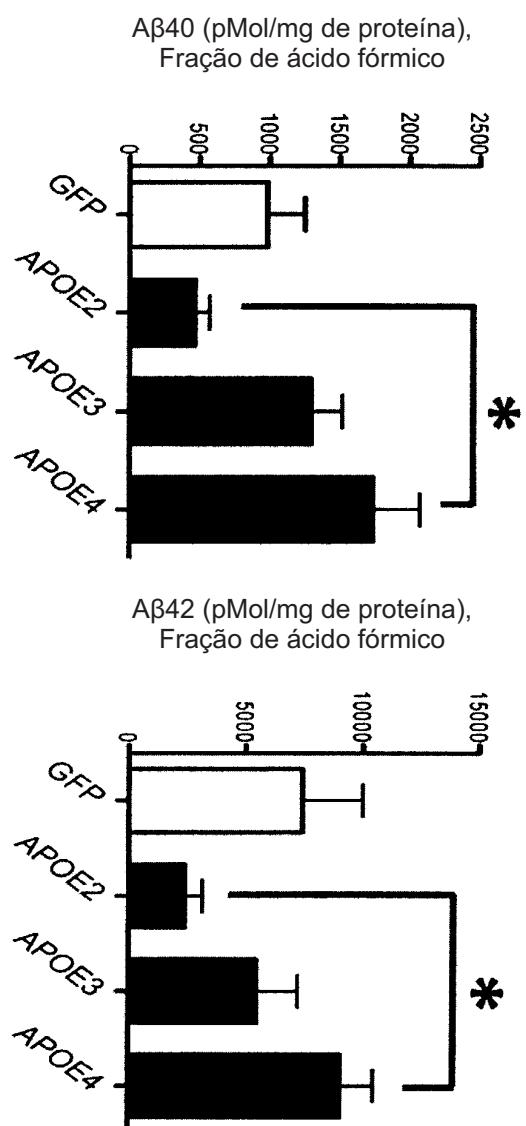


FIG. 10C

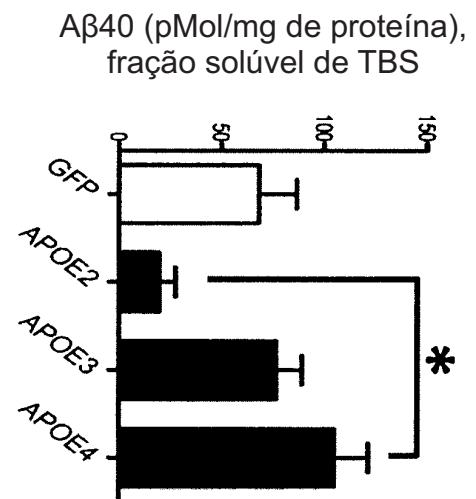


FIG. 10D

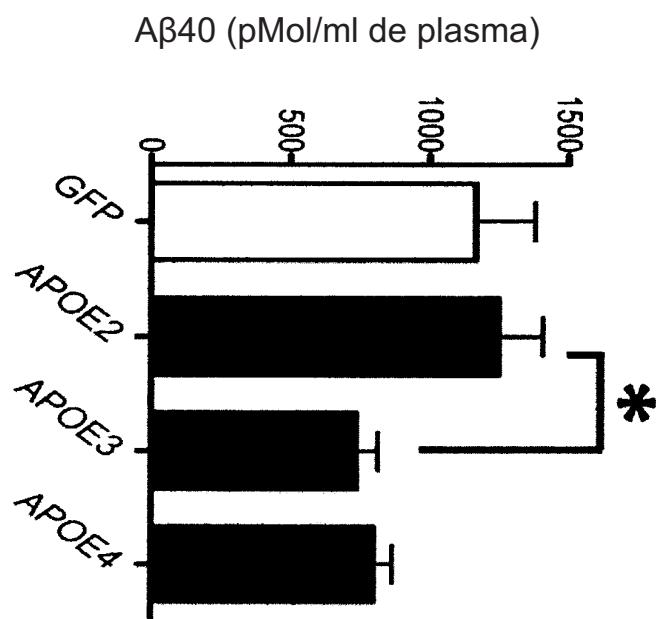
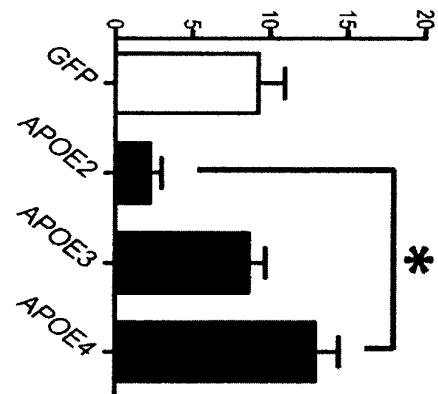
A β 42 (pMol/mg de proteína), fração solúvel de TBS

FIG. 11A

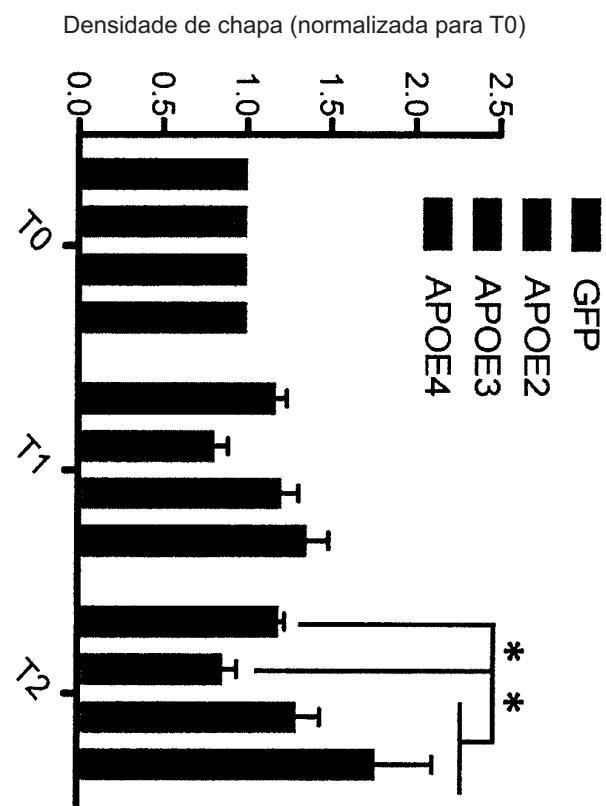


FIG. 11B

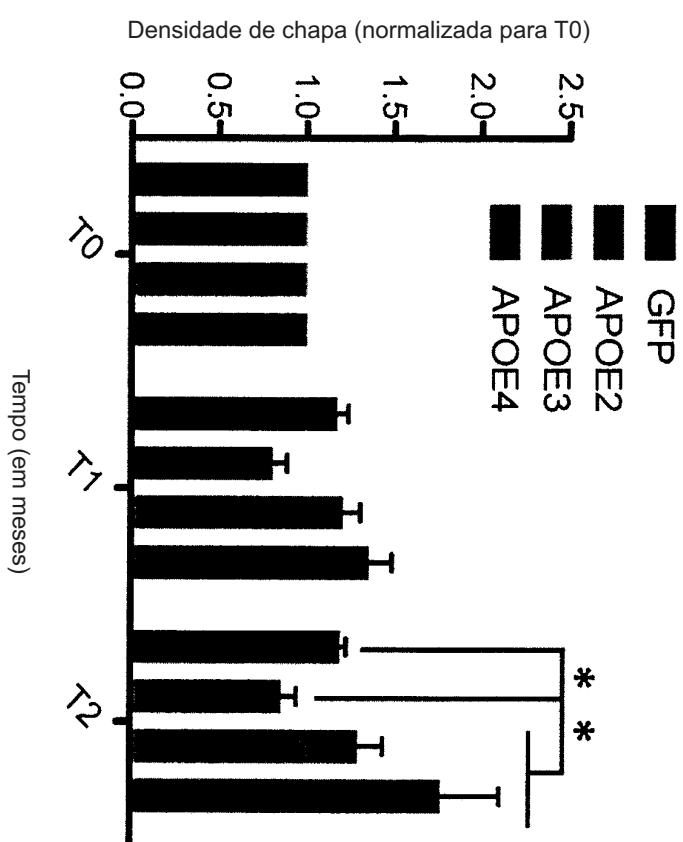


FIG. 12B

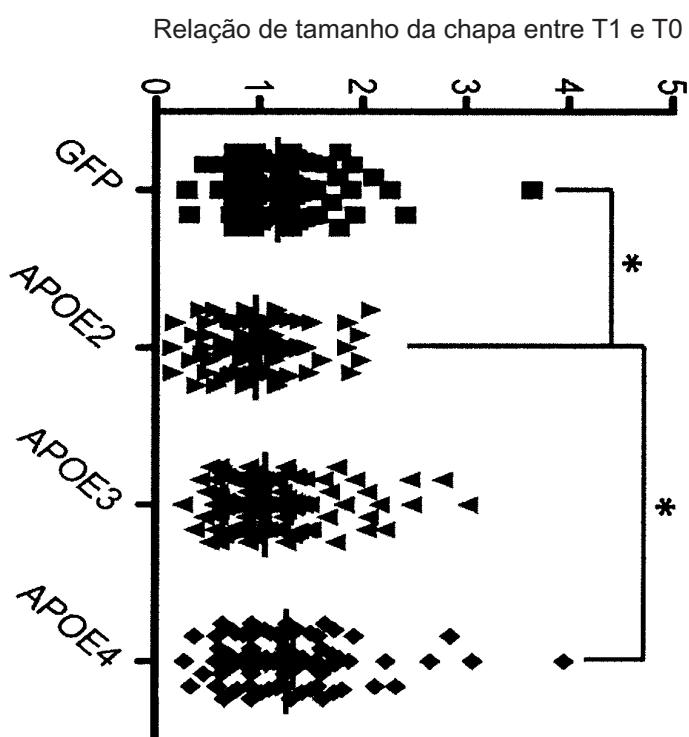


FIG. 13A

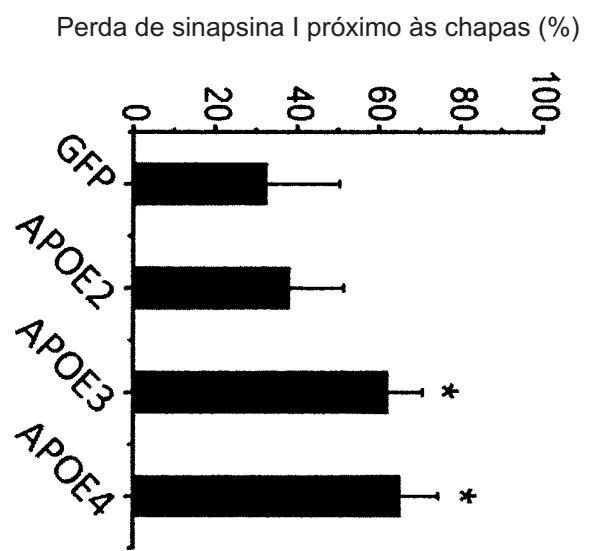


FIG. 13B

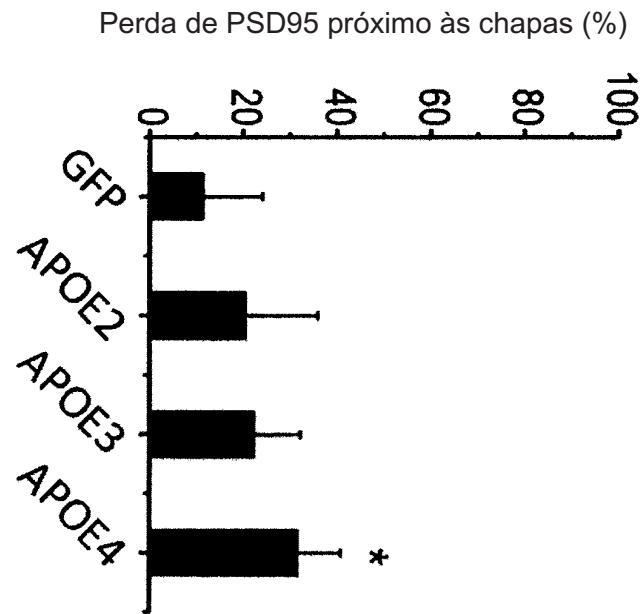


FIG. 13C

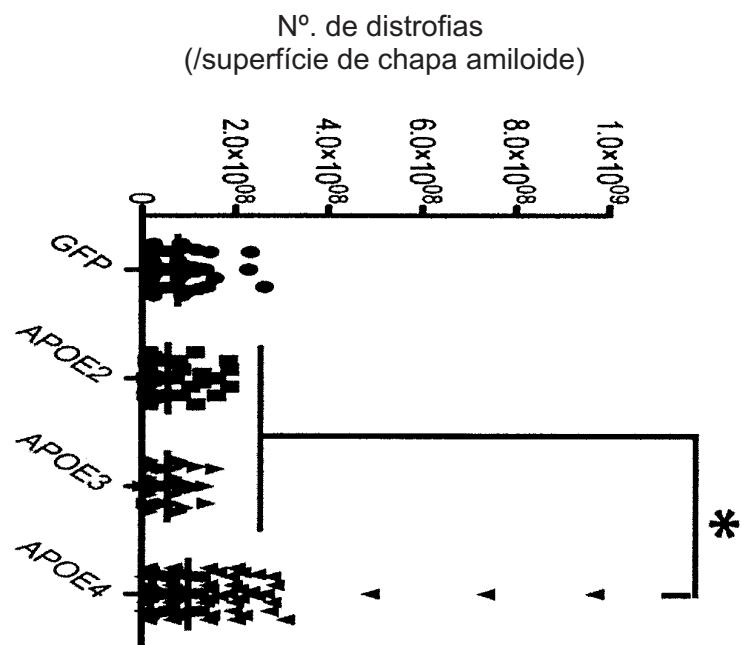


FIG. 14

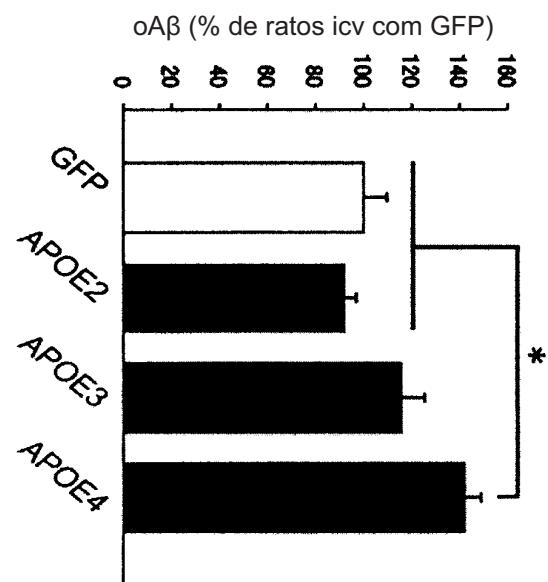


FIG. 15A

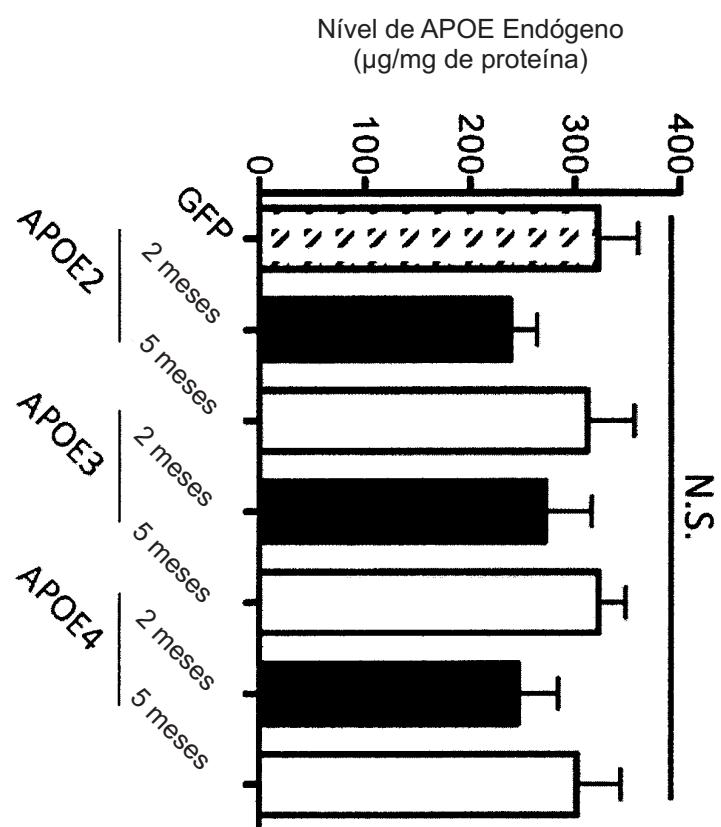


FIG. 15B

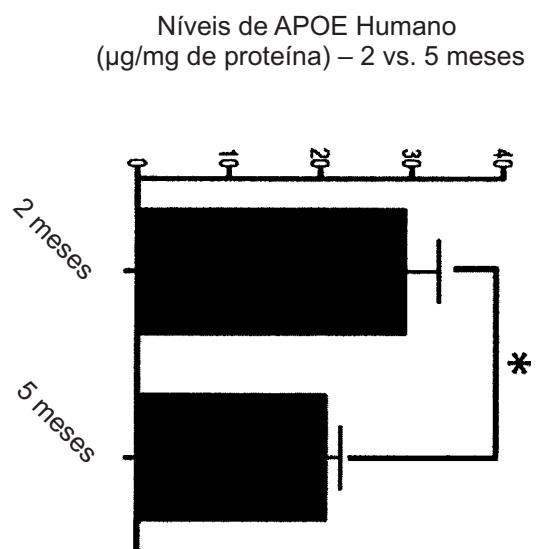


FIG. 16A

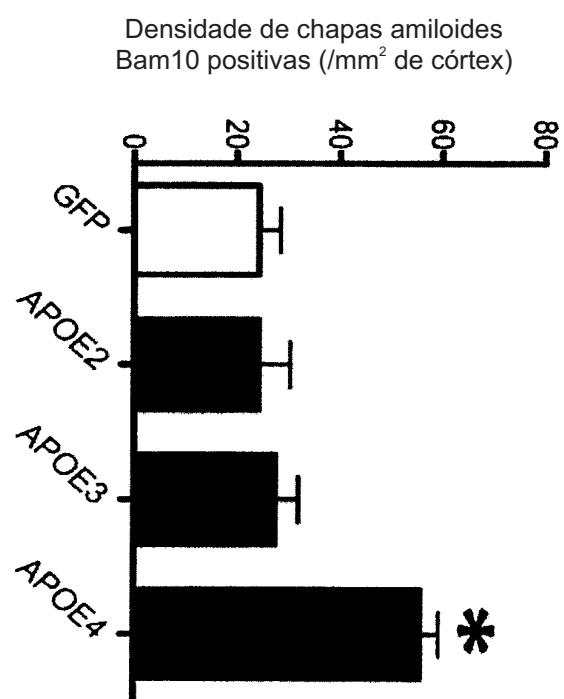


FIG. 16B

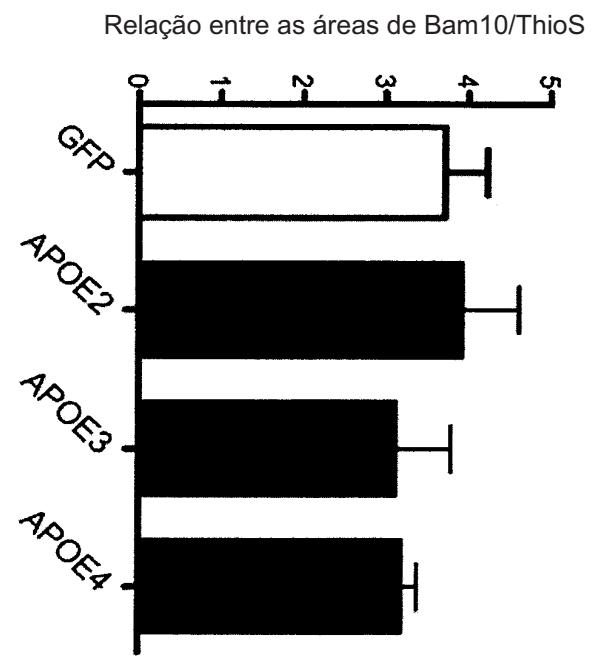


FIG. 16C

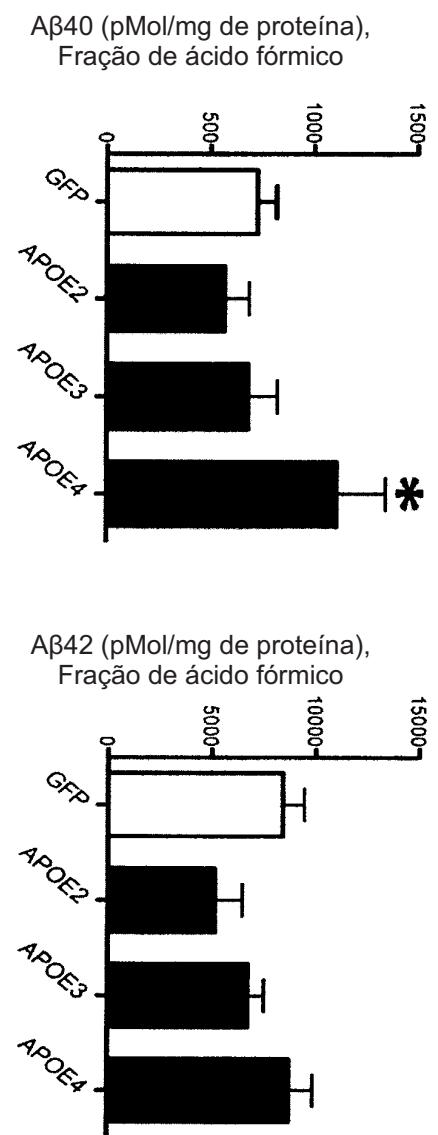


FIG. 17A

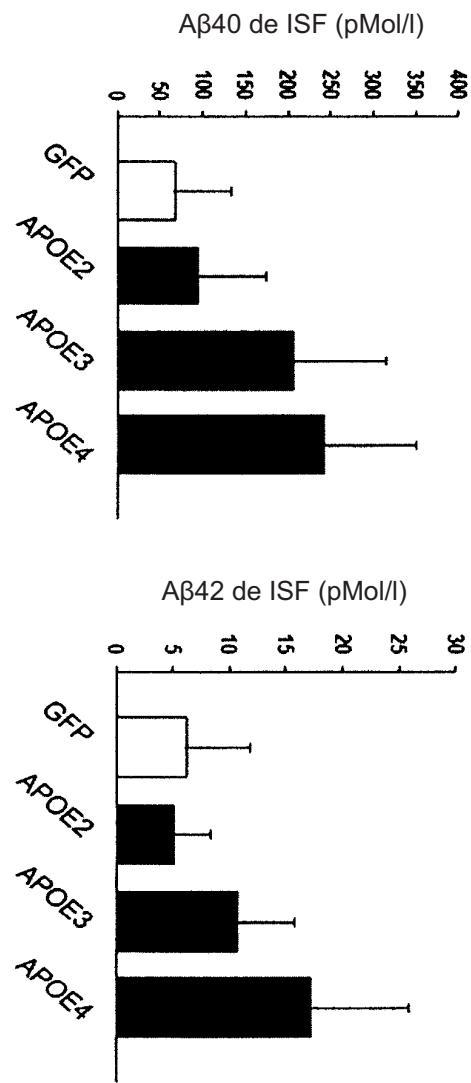


FIG. 17B

