



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

(21) BR 112020014625-0 A2



(22) Data do Depósito: 17/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/12/2020

(54) **Título:** PROTEÍNA DE CAPSÍDEO DE RAAV MODIFICADA PARA TERAPIA GÊNICA

(51) **Int. Cl.:** A61K 35/76; C12N 15/68.

(30) **Prioridade Unionista:** 17/01/2018 EP 18152133.7.

(71) **Depositante(es):** MEIRAGTX UK II LIMITED; UNIVERSITÄT HEIDELBERG.

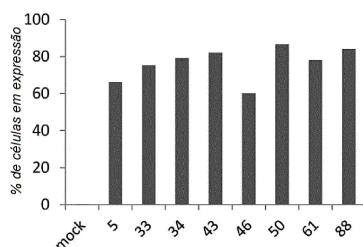
(72) **Inventor(es):** JONATHAN DOUGLAS FINN; DIRK GRIMM; KATHLEEN BÖRNER; SUSANNE ANNA SNOEK; NIELS BROEKSTRA; SABINE MARIA GERTRUDE VAN DER SANDEN.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2019051128 de 17/01/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/141765 de 25/07/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 17/07/2020

(57) **Resumo:** A invenção se refere a vírions de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) para terapia gênica, em que os vírions de rAAV compreendem uma proteína de capsídeo inovadora. Em particular, a invenção se refere ao uso de tais vírions em terapia gênica para o tratamento de uma doença artrítica, como, por exemplo, artrite reumatoide ou sintomas da mesma, preferencialmente por administração intraarticular.



“PROTEÍNA DE CAPSÍDEO DE RAAV MODIFICADA PARA TERAPIA GÊNICA”

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere ao campo de terapia gênica com base em vírus adenoassociado recombinante (rAAV), em particular, ao uso de um rAAV de capsídeo mutante no tratamento ou na prevenção de uma doença artrítica.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Os vetores de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) demonstraram excelentes perfis de segurança e de eficácia para a entrega de genes em seres humanos *in vivo*. Portanto, vetores de rAAV têm sido usados extensivamente para terapia gênica *in vivo* e se mostraram seguros e eficazes em modelos pré-clínicos assim como em testes clínicos. Os vetores de rAAV tiveram êxito em vários testes clínicos de terapia gênica para várias doenças incluindo hemofilia B, hemofilia A, fibrose cística, deficiência de alfa-1 antitripsina, atrofia muscular espinhal (SMA), doença de Parkinson, distrofia muscular de Duchenne e amaurose congênita de Leber (Selot *et al.*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 14, 1072-1082). Alipogene tiparvovec (Glybera®, uniQure) recebeu autorização para ser comercializado na Europa como uma terapia gênica para o tratamento de deficiência de lipase de lipoproteína (LPLD). Subsequentemente, a aprovação para fármaco de terapia gênica foi concedida para Talimogene laherparepvec à base do vírus do herpes para o tratamento contra o câncer de pele (T-Vec, Imlygic®, Amgen) e para terapia Strimvelis gênica com base retroviral de célula-tronco *ex vivo* para o tratamento contra ADA-SCID (GSK).

[003] A terapia gênica com base em vetor rAAV também foi aplicada em artrite reumatoide (RA), que é uma doença inflamatória crônica que afeta ~1% da população. Uma patologia de RA se estende por toda a articulação sinovial. A natureza localizada da articulação torna a terapia gênica *in vivo* interessante. Foram aplicadas terapias que fornecem proteínas anti-inflamatórias cujo objetivo foi a comutação do equilíbrio em RA para a estado anti-inflamatório.

[004] Muito se focou no desenvolvimento de proteínas de capsídeo AAV com propriedades desejadas. Tais propriedades podem incluir maior eficiência de transdução, tropismo de tecido/órgão, não ter como alvo tecidos/órgãos não

desejados ou evitação de anticorpos neutralizantes pré-existentes.

[005] No entanto, ainda há uma necessidade na técnica de aprimorar adicionalmente vetores de terapia gênica rAAV. Em particular, há uma necessidade de aprimorar o uso de vetores de terapia gênica rAAV em doença artrítica e, mais precisamente, aprimorar a eficiência de entregar material genético ao tecido tido como alvo, tal como a articulação sinovial ou tipos específicos de célula dentro da articulação sinovial, de preferência, para sinoviócitos do tipo fibroblastos (FLS).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Num primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um vírion de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) que compreende uma proteína de capsídeo modificada para uso no tratamento ou prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica, em que a proteína de capsídeo modificada compreende, na parte C-terminal da proteína, uma sequência de aminoácidos Z, cujos resíduos são expostos na superfície da proteína de capsídeo. De preferência, a sequência de aminoácidos Z:

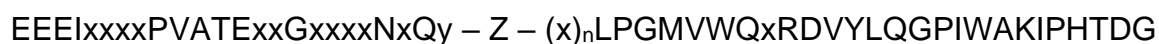
[007] a. compreende ou consiste numa sequência de resíduos de aminoácido da fórmula I:



[008] em que x representa um resíduo de aminoácido único e em que y representa 0, 1 ou 2 resíduos de aminoácido; e

[009] b. está presente numa localização correspondente a uma posição 100 – 200, preferencialmente 120 – 180, mais preferencialmente 130 – 170, mais preferencialmente 140 – 160 resíduos de aminoácido da terminação C de uma proteína de capsídeo de AAV do tipo selvagem.

[010] De preferência, resíduos de aminoácidos da fórmula I estão expostos na superfície da proteína de capsídeo. Numa modalidade preferencial, a sequência Z está compreendida na proteína de capsídeo modificada numa localização representada pela fórmula II:



[011] em que Z, x e y são conforme definidos acima; e em que n é 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15.

[012] Numa modalidade preferencial, a presente invenção se refere a um vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada para uso no tratamento ou na prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou na prevenção de sintomas associados a doença artrítica, em que a proteína de capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em: i) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 1 e em que os aminoácidos nas posições 588 – 602 da SEQ ID NO: 1 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 11; ii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 2 e em que os aminoácidos nas posições 585 – 599 da SEQ ID NO: 2 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10; iii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 3 e em que os aminoácidos nas posições 587 – 601 da SEQ ID NO: 3 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9; iv) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 4 e em que os aminoácidos nas posições 586 – 600 da SEQ ID NO: 4 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 8; v) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 5 e em que os aminoácidos nas posições 588 - 602 da SEQ ID NO: 5 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9; vi) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 6 e em que os aminoácidos nas posições 588 - 602 da SEQ ID NO: 6 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 8; e vii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 7 e em que os aminoácidos nas posições 587 – 601 da SEQ ID NO: 7 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 12; em que a proteína de capsídeo modificada fornece um aumento pelo menos duplo na expressão em comparação a uma

proteína de capsídeo não modificada com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 13 – 19, quando testado sob as mesmas condições, em que, de preferência, a proteína de capsídeo não modificada tem a sequência de aminoácidos que tem uma SEQ ID NO: 19 ou tem o mesmo serotipo que a proteína de capsídeo modificada.

[013] Numa modalidade preferencial, a proteína de capsídeo modificada fornece um aumento de pelo menos duas vezes em expressão, em células FLS humanas, em comparação à proteína de capsídeo não modificada com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 13 – 19, quando testado sob as mesmas condições, em que preferencialmente a proteína de capsídeo não modificada tem a sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 19 ou tem o mesmo serotipo que a proteína de capsídeo modificada.

[014] Alternativamente, ou em combinação com qualquer uma das modalidades antecedentes. Numa modalidade preferencial da presente invenção, a proteína de capsídeo compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:1 a 7.

[015] Alternativamente, ou em combinação com qualquer uma das modalidades anteriores, numa modalidade preferencial da presente invenção, o vírion rAAV compreende uma sequência de nucleotídeos que compreende pelo menos uma sequência de repetição terminal invertida de AAV (ITR). De preferência, o vírion compreende adicionalmente uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse. Ainda com mais preferência, a sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse está localizada entre duas sequências de ITR de AAV.

[016] Numa modalidade preferencial, o produto gênico de interesse trata, previne ou suprime sintomas associados a uma doença artrítica, em que preferencialmente o produto gênico de interesse é selecionado do grupo que consiste em interleucinas, moduladores imunes, anticorpos, shRNA, miRNA, RNA guia, lncRNA, fatores de crescimento, proteases, nucleotidasas/nucleosidasas, peptídeos, inibidores de protease, inibidores, enzimas e combinações dos mesmos, e em que mais preferencialmente o produto gênico de interesse é pelo menos um de CD39, CD73 e IFN- β .

[017] Alternativamente, ou em combinação com qualquer uma das modalidades anteriores, numa modalidade preferencial da presente invenção, o vírion rAAV compreende pelo menos um dentre: (i) um polinucleotídeo que compreende uma sequência que codifica pelo menos um RNA guia; em que o ou cada RNA guia é substancialmente complementar a uma sequência-alvo de polinucleotídeo (ou sequências-alvo de polinucleotídeo) num genoma; e (ii) um polinucleotídeo que compreende uma a sequência que codifica uma nuclease; em que a nuclease forma um complexo de ribonuclease com o RNA guia, e em que o complexo de ribonuclease faz rupturas DNA dupla fita sítio-específico (DSDB) no genoma.

[018] Em outro aspecto, a presente invenção se refere a uma composição rAAV para uso no tratamento ou na prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou na prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica, em que a composição de rAAV compreende um vírion rAAV de acordo com a invenção e um carreador farmacologicamente aceitável. Numa modalidade, a composição de rAAV compreende adicionalmente um capsídeo vazio numa razão entre capsídeo vazio e vírion de rAAV de pelo menos 1:1, pelo menos 5:1 ou pelo menos 10:1.

[019] Em outro aspecto, a presente invenção se refere a uma composição de rAAV e um imunossupressor para uso no tratamento ou na prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou na prevenção de sintomas associados com uma doença artrítica, em que a composição de rAAV é uma composição de rAAV de acordo com a invenção e, de preferência, em que o tratamento ou prevenção compreende a administração da composição de rAAV e a administração do imunossupressor a um individual.

[020] Alternativamente, ou em combinação com qualquer uma das modalidades anteriores, anteriores, numa modalidade preferencial da presente invenção, a doença artrítica é selecionada do grupo que consiste em artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide juvenil, osteoartrite (OA), gota, pseudogota, espondilartrite (SpA), artrite psoriática, espondilite anquilosante, artrite séptica, artrite, artrite idiopática juvenil, trauma contuso, substituição de articulação e doença de Still.

[021] Alternativamente, ou em combinação com qualquer uma das

modalidades anteriores, anteriores, numa modalidade preferencial da presente invenção, o vírion de rAAV ou a composição de rAAV é administrado sistêmica e/ou sistematicamente. Numa modalidade preferencial, pelo menos um dentre a composição de rAAV e o imunossupressor é administrado localmente. De preferência, a administração local é uma administração intra-articular.

[022] Num aspecto adicional, a presente invenção se refere a um método para tratar, impedir ou suprimir sintomas associados a uma doença artrítica, em que o método compreende a etapa de administração intra-articular de um medicamento que compreende uma quantidade eficaz de um vírion de rAAV ou uma composição de rAAV de acordo com a invenção.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[023] Os inventores constataram que um vírion de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) que compreende uma proteína de capsídeo modificada é surpreendentemente eficiente na transdução de células e, em particular, eficiente na transdução de células da articulação sinovial. Visto que sinoviócitos do tipo fibroblasto (FLS) tipicamente são a célula-alvo primária na articulação no tratamento de doenças artríticas, tal como, por exemplo, artrite reumatoide, o objetivo da presente invenção é fornecer proteínas de capsídeo que são aprimoradas numa ou mais dentre as seguintes propriedades: i) níveis superior de expressão no tecido sinovial, em particular, em FLS; ii) tropismo de tecido sinovial aprimorado, em particular, tropismo aprimorado para FLS; e/ou iii) desalveamento aprimorado para tecido/órgãos não desejados após a administração de rAAV em comparação a proteínas de capsídeo conhecidas na técnica. Em particular, estas propriedades do vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada da invenção são aprimoradas em comparação a proteínas de capsídeo não modificadas, de preferência, a proteína de capsídeo do tipo selvagem do mesmo serotipo igual ao da proteína de capsídeo modificada e/ou das proteínas de capsídeo AAV5. Estabeleceu-se obviamente que o capsídeo AAV5 gera os níveis mais altos de expressão de FLS quando comparados a outros serotipos de AAV (Adriaansen et al. (2005) Ann Rheum Dis 64:1677-1684; Apparailly et al. (2005) Hum. Gene Ther. 16:426-434). Uma vez que é o capsídeo que confere as propriedades de tropismo tecidual/celular, os capsídeos modificados descritos na

presente invenção têm a propriedade de potencial de transdução de FLS intensificado, de preferência, quando comparado a AAV5 não modificado. Em particular, é preferencial que as proteínas de capsídeo da presente invenção forneçam níveis superiores de expressão em tecido sinovial, em particular, em FLS, de preferência, mediante administração intra-articular, em comparação a proteínas de capsídeo não modificadas (ou seja, é a mesma proteína de capsídeo sem a modificação que deve ser testada, de preferência, do mesmo serotipo que as proteínas de capsídeo modificado), de preferência, proteínas de capsídeo não modificadas do tipo selvagem (de preferência, do mesmo serotipo que as proteínas de capsídeo modificado), com mais preferência, proteínas de capsídeo AAV5 ou wtAAV5 não modificadas.

[024] Por conseguinte, num primeiro aspecto, a invenção se refere a um vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada. O vírion de rAAV, conforme definido no presente documento, é particularmente útil para uso na terapia gênica.

[025] Conforme usado no presente documento, “terapia gênica” é a inserção de sequências de ácido nucleicos (tais como, por exemplo, um transgene (também denominado de sequência de nucleotídeos que codificam um produto gênico de interesse) conforme definido no presente documento abaixo) nas células e/ou tecidos de um indivíduo a fim de tratar ou prevenir uma doença ou distúrbio.

[026] AAV pode infectar tanto células em divisão quanto quiescentes, e a infecção ocorre por interação das proteínas de capsídeo com um receptor de célula membrana, seguido por endocitose do vírion de AAV. O AAV pertence ao gênero Dependovirus que, por sua vez, pertence à subfamília dos Parvovirinae, também denominados de parvovírus, que têm capacidade para infectar vertebrados. Os Parvovirinae pertencem a uma família de vírus de animal com DNA, isto é, a família Parvoviridae. Conforme pode ser deduzido do nome de seu gênero, os membros do Dependovirus são exclusivos pelo fato de que normalmente precisam de confecção com um vírus auxiliar, tal como adenovírus ou vírus herpes para infecção produtiva na cultura celular. O gênero Dependovirus inclui AAV, que infecta normalmente humanos e vírus relacionados que infectam outros animais de sangue quente (*por exemplo*, vírus adenoassociados bovinos, caninos, equinos e ovinos).

Mais informações sobre parvovírus e outros membros da Parvoviridae são descritas em Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Virus e Their Replication", Capítulo 69 em Fields Virology (3ª Edição 1996). A título de conveniência, a presente invenção é exemplificada e descrita adicionalmente no presente documento a título de referência ao AAV. No entanto, entende-se que a invenção não se limita a AAV, porém pode ser igualmente aplicada outros parvovírus.

[027] A organização genômica de todos os serotipos de AAV é muito semelhante. O genoma de AAV é uma molécula de DNA de fita simples linear que tem comprimento menor que cerca de 5.000 nucleotídeos (nt). As repetições terminais invertidas (ITRs) flanqueiam as sequências de nucleotídeos de codificação exclusivas para as proteínas de replicação não estrutural (Rep) e para as proteínas estruturais (VP). As proteínas de VP (VP1, -2 e -3) formam o envoltório de capsídeo ou da proteína com o auxílio da proteína de ativação de conjunto (AAP) (para alguns serotipos), que é codificado num quadro de leitura aberta alternativo que se sobrepõe àquele do VP2/VP3. Os nucleotídeos terminais são autocomplementares e são organizados de modo que um duplex intramolecular energeticamente estável que forma um grampo em formato de T possa ser formado. O tamanho dos nucleotídeos terminais depende do serotipo. Por exemplo, no caso de AAV2, do terminal 145 nt, 125 nt são autocomplementares, e os demais 20 nt permanecem de fita simples. Estas estruturas de grampo funcionam como uma origem para replicação de DNA, servindo como iniciadores para o complexo DNA-polimerase celular. Seguindo a infecção por AAV do tipo selvagem (wtAAV) em células de mamíferos, as proteínas Rep (*isto é*, Rep78 e Rep52) são expressas dos mRNAs transcritos pelo promotor p5 e pelo promotor p19, respectivamente. Ambas as proteínas Rep têm uma função na replicação do genoma viral. Um evento de splicing no ORF da Rep resulta na expressão de, na realidade, quatro proteínas Rep (*isto é*, Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40). No entanto, mostrou-se que as proteínas Rep78 e Rep52, codificadas pelos mRNAs não submetidos a splicing, em células de mamíferos são suficientes para produção do vetor de AAV. A produção de wtAAV ou rAAV nas células de mamíferos depende, ademais, numa combinação de uso alternativo de dois sítios aceitadores de splicing e a utilização subideal de um códon de iniciação de ACG para VP2, o que garante expressão adequada de

todas as três proteínas de capsídeo numa razão aproximada de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3).

[028] Um “vírion de rAAV” (também denominado de “vetor de rAAV” ou um “vetor transgênico de rAAV” no presente documento), conforme usado no presente documento significa um capsídeo de AAV que compreende uma sequência de ácido nucleico não nativo. Tal sequência em rAAV é geralmente flanqueada por sequências de ITR, de preferência, do wtAAV, e codifica, de preferência, um produto gênico de interesse, tal como, por exemplo, um transgene ou braços de homologia. Dito de outro modo, um vírion de rAAV significa um genoma de rAAV, que compreende (i) uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse e (ii) pelo menos uma sequência de ITR de AAV, encapsidada pelas proteínas de capsídeo. Um genoma de rAAV pode ter um ou, de preferência, todos os genes de wtAAV apagados, porém pode ainda compreender sequências de ácido nucleico de ITR funcional. De preferência, o vírion de rAAV não compreende nenhuma sequência de nucleotídeos que codifica proteínas virais, tais como genes de *rep* (replicação) ou de *cap* (capsídeo) do AAV. Deste modo, um vírion de rAAV é distinguido de um vírion de wtAAV, visto todo o genoma viral, ou uma parte do mesmo, foi substituído por uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse, que é um ácido nucleico não nativo com relação à sequência de ácido nucleico de AAV, conforme definido adicionalmente no presente documento.

[029] Numa modalidade preferencial, um vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada da invenção é para uso no tratamento ou na prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou na prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica. O uso médico (*por exemplo*, terapia gênica para tratamento ou prevenção de (sintomas associados à) doença artrítica) descrito no presente documento é formulado como um vírion de rAAV de acordo com a invenção para uso como um medicamento para prevenção ou tratamento da doença (ou doenças) e/ou do distúrbio (ou distúrbios) definidos no presente documento, porém pode ser igualmente formulado como (i) um método de prevenção ou de tratamento contra a doença (ou doenças) e/ou distúrbio (ou distúrbios) definidos no presente documento ou sintomas dos mesmos que

compreendem administrar uma quantidade suficiente ou eficaz de um vírion de rAAV de acordo com a invenção a indivíduo com necessidade do mesmo, como (ii) um vírion de rAAV de acordo com a invenção para uso na preparação de um medicamento para prevenir ou tratar a doença (ou doenças) e/ou distúrbio (ou distúrbios) definidos no presente documento, ou como (iii) uso de um vírion de rAAV de acordo com a invenção para a prevenção ou tratamento da doença (ou doenças) e/ou distúrbio (ou distúrbios) definidos no presente documento. Tais usos médicos são todos abrangidos pela presente invenção. De preferência, a proteína de capsídeo modificada compreende na parte C-terminal da proteína uma sequência de aminoácidos Z cujos resíduos são expostos na superfície da proteína de capsídeo.

[030] Conforme usado no presente documento, os termos “tratar”, “tratamento” ou “tratando” se referem à aplicação ou administração de um vírion de rAAV da invenção a um indivíduo que tem uma doença artrítica, em que o objeto deve curar, ou reverter parcial ou completamente, aliviar, melhorar, inibir, atrasar, suprimir, retardar ou interromper a progressão ou gravidade de uma doença artrítica ou dos sintomas associados à doença artrítica. O termo “tratar” inclui reduzir ou aliviar pelo menos um efeito adverso ou sintoma da doença artrítica. O tratamento é geralmente “eficaz”, caso um ou mais sintomas ou marcadores clínicos sejam reduzidos. Alternativamente, o tratamento é “eficaz”, caso a progressão da doença artrítica é reduzido ou impedido. Ou seja, “tratamento” inclui não apenas o aprimoramento de sintomas ou marcadores como também uma cessação ou pelo menos retardamento do progresso ou agravamento dos sintomas que são esperados na ausência do tratamento. Os resultados clínicos ou desejados incluem, porém sem limitação, alívio de um ou mais sintomas, diminuição da extensão da doença, estado estabilizado da doença (*isto é*, sem agravamento), atraso ou retardamento da progressão da doença, melhora ou palição da doença e remissão (seja parcial ou total), seja detectável ou não detectável. O termo “tratamento” de uma doença artrítica também inclui fornecer alívio dos sintomas ou efeitos colaterais da doença artrítica (incluindo tratamento paliativo). Conforme usado no presente documento, o termo “prevenir”, “prevenção” ou “preventivo” (também denominado de profilático) se refere à aplicação ou administração de um

vírião de rAAV de acordo com a invenção a um indivíduo que tem uma predisposição a uma doença artrítica, com o intuito de atrasar ou prevenir o início, aliviar, melhorar, aliviar, inibir a progressão, reduzir gravidade e/ou reduzir incidência de um ou mais sintomas ou recursos de uma futura doença artrítica. Deste modo, um vírião de rAAV, de acordo com a invenção, pode ser administração a um indivíduo que não inibe sinais de uma doença artrítica e/ou a um indivíduo que exibe apenas sinais precoces de uma doença artrítica, de preferência, com intuito de diminuir o risco de desenvolver a patologia associada à doença artrítica.

[031] O termo “cura” ou “curar”, conforme usado no presente documento, significa aliviar completamente um ou mais, de preferência, todos, dentre os sintomas ou características de uma doença artrítica. O termo “atrasar” ou “atraso”, conforme usado no presente documento, significa atrasar o início e/ou inibir a progressão e/ou reduzir a gravidade de um ou mais dentre os sintomas ou características da doença artrítica.

[032] Numa modalidade preferencial, a proteína de capsídeo modificada da invenção fornece um aumento de pelo menos duas vezes na expressão em comparação a uma proteína de capsídeo não modificada, quando testado sob as mesmas condições. De preferência, a proteína de capsídeo não modificada é uma proteína de capsídeo do mesmo serotipo que a proteína de capsídeo modificada, porém sem a modificação que deve ser testada. Com mais preferência, a proteína de capsídeo não modificada é uma proteína de capsídeo do tipo selvagem (wt) do mesmo serotipo que a proteína de capsídeo modificada, em que a proteína de capsídeo wt tem, de preferência, uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NO: 13 – 19. Alternativamente, é preferencial que a proteína de capsídeo não modificada tem uma sequência de aminoácidos selecionados do grupo que consiste em SEQ ID NO: 13 – 19. Com máxima preferência, a proteína de capsídeo não modificada tem a sequência de aminoácidos, conforme mostrado na SEQ ID NO: 19. As proteínas de capsídeo não modificadas preferenciais podem depender do tecido que deve ser tido como alvo pelo vírião de rAAV. Por exemplo, um rAAV com proteínas de capsídeo AAV5 parece se um vírião de escolha para células FLS (Apparilly et al. (2005) Human Gene Therapy 16(4):426-434; Adriaansen et al. (2005) Ann. Rheum. Dis.

64(12):1677-1684) e portanto – independentemente do serotipo original dos vírions mutantes de rAAV – o vírion de controle de rAAV de preferência compreende proteínas de capsídeo de AAV5, com mais preferência, proteína de capsídeo AAV5 do tipo selvagem (wtAAV5), com mais preferência, a proteína de capsídeo de AAV5 tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:19, com ainda mais preferência, o vírion de controle de rAAV é um vírion rAAV5. Um vírion de controle de rAAV é um vírion de rAAV que compreende proteínas de capsídeo não modificadas, conforme definido no presente documento, em vez das proteínas de capsídeo modificado. Numa modalidade preferencial, o vírion de rAAV (que compreende as proteínas de capsídeo modificado) fornece expressão superior mediante transdução *in vitro* em Sinoviócitos do Tipo Fibroblasto de pacientes com artrite reumatoide (RA-FLS) e/ou HEK 293, de preferência, HEK293T, células em comparação ao mesmo vírion de rAAV com proteínas de capsídeo não modificadas, conforme definido no presente documento, em vez de proteínas de capsídeo modificado, com o uso de um método, conforme descrito nos Exemplos. Em outras palavras, diferente das proteínas de capsídeo, o vírion de rAAV e o vírion de controle de rAAV são, de preferência, idênticos. De preferência a eficiência da transdução é detectada num ensaio de transdução de *in vitro* : medindo-se os níveis de expressão de um gene repórter codificado pelo transgene, tal como GFP, YFP e/ou Luciferase. Numa modalidade preferencial, o teste para determinar a expressão é um ensaio de transdução *in vitro*, conforme descrito no exemplo 2/3. Em suma, os RA-FLS (isolado, conforme descrito em van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427) são colocados em placa a 2.500 células/poço ou células HEK293T (células renais embriônicas humanas) são colocados em placa a 40.000 células/poço numa placa com 96 poços (DMEM-GlutaMAX-I (Gibco, referência 31966-021), 10% de FBS (Soro Bovino Gold inativado por calor (HI), Gibco referência A15-151), penicilina a 100 µg/ml/estreptomicina a 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, referência P0781; 37 °C/5% de CO₂). Após 24 horas, o sobrenadante é removido e substituído pelo meio (DMEM-glutaMAX-I (Gibco, referência 31966-021), 0,001% de Pluronic F68 (Sigma, referência p5559)) que contém os vírions mutantes de rAAV ou os vírions de controle de rAAV – todos expressando proteína fluorescente amarela (yFP) e/ou luciferase sob controle de

um promotor de citomegalovírus (CMV) – em várias infecções (MOI) de 10.000, 20.000 e 100.000. Os lisados crus (*isto é*, sobrenadantes não purificados de células submetidas à transfecção com todos os plasmídeos necessários para a produção de rAAV e que contém vírions que expressam repórter) ou AAV purificado (de preferência, com base na purificação de Iodixanol ou purificação de gradiente de densidade de cloreto de céσιο (CsCl)) podem ser usados. Quatro horas após a transdução, o meio (DMEM-GlutaMAX-I, 10% de FBS penicilina a 100 U/ml, estreptomicina a 100 µg/ml) que contém doxorubicina (Sigma, referência D1515; concentração final 0,4 µM), FBS (concentração final a 1%), é adicionado. Após 48 horas (HEK293T) ou 4 a 6 dias (RA-FLS), as células são submetidas a ensaio para a porcentagem de células que expressam YFP ou luciferase por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. De preferência, o ensaio de transdução *in vitro* é realizado várias vezes com FLS isolado de diferentes pacientes, tal como, por exemplo FLS isolado de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais pacientes.

[033] Um “serotipo” é definido tradicionalmente com base numa falta de reatividade cruzada entre anticorpos para um vírus em comparação a outro vírus. Tais diferenças de reatividade cruzada são normalmente devidas a diferenças nas sequências de proteína de capsídeo/determinantes antigênicos (*por exemplo*, devido às diferenças de sequência VP1, VP2 e/ou VP3 do serotipos AAV). Sob a definição tradicional, um serotipo significa que o vírus de interesse foi testado em relação ao soro específico para todos serotipos existentes e caracterizados para neutralizar a atividade, e não foi constatado que algum anticorpo neutralize o vírus de interesse. Visto que mais isolados de vírus de ocorrência natural são constatados e mutantes de capsídeo são gerados, pode haver ou não diferenças serológicas com qualquer um dos serotipos existentes. Deste modo, nos casos em que o novo AAV não tem diferença serológica, este novo AAV é um subgrupo ou variante do serotipo correspondente. Em muitos casos, o teste de serologia para neutralizar a atividade tem que ser realizado em vírus mutante com modificações de sequências de capsídeos para determinar se são de outro serotipo de acordo com a definição tradicional de serotipo. Consequentemente, a título de conveniência e para evitar repetição, o termo “serotipo” se refere amplamente tanto a vírus distintos em termos de serologia (*por exemplo*, AAV) quanto a vírus (*por*

exemplo, AAV) que não são distintos em termos de serologia que podem estar dentro de um subgrupo ou uma variante de um dado serotipo.

[034] “Transdução” se refere à transferência de um transgene numa célula hospedeira receptora por um vetor viral. A transdução de uma célula-alvo por um vírion de rAAV da invenção causa a transferência do transgene contido neste vírion de rAAV na célula submetida à transdução. “Célula hospedeira” ou “célula-alvo” se refere à célula na qual a entrega de DNA ocorre, tal como os sinoviócitos ou células sinoviais de um indivíduo ou, tal como células FLS isoladas de pacientes ou células HEK293T no caso do ensaio de transdução *in vitro*. Os vetores AAV podem submeter à transdução tanto células em divisão quanto as que não estão em divisão. Numa célula que compreende um produto gênico de interesse, tal como, por exemplo, GFP, o produto gênico de interesse foi introduzido/transferido/submetido à transdução por meio da “transdução” de rAAV da célula. Uma célula na qual o transgene foi introduzido é denominado de célula “submetida” à transdução.

[035] A célula hospedeira receptora em que o transgene é submetido à transdução é, de preferência, uma célula que é afetada pela doença que deve ser tratada, tal como, por exemplo, células sinoviais, mais especificamente FLS, macrófagos, monócitos, neutrófilos, osteoblastos, osteoclastos, condrócitos, T-linfócitos, células dendríticas, células plasmáticas, mastócitos, linfócitos B no caso de uma doença artrítica. O “sinóvio” ou “tecido sinovial” ou “células sinoviais”, conforme usado no presente documento, se refere ao forro celular que reveste as superfícies não cartilaginosas das articulações sinoviais, conforme descrito adicionalmente em Tak (2000, Examination of the synovium and synovial fluid. In: Firestein GS, Panyani GS, Wollheim FA editors. Artrite Reumatoide. Nova Iorque: Oxford Univ. Press, Inc. 55-68) e incorporado no presente documento a título de referência. O sinóvio consiste na camada de forro íntimo (ou camada de forro sinovial) e o subforro sinovial (subsinóvio), que se une à cápsula de articulação. A camada de forro íntimo compreende macrófagos íntimos (ou sinoviócitos do tipo macrófagos ou sinoviócitos do tipo A) e FLS (ou sinoviócitos do tipo B). Portanto, o “sinóvio” pode ser substituído por ou é sinônimo com, “tecido sinovial”. Uma célula sinovial pode incluir uma célula presente no sinóvio incluindo FLS e sinoviócitos do

tipo macrófagos. Uma célula sinoviócito também pode ser um neutrófilo, células T, B e/ou células de tecido conjuntivo, que podem estar todas presentes no sinóvio.

[036] Os “sinoviócitos do tipo fibroblasto” (FLS) são células de origem mesenquimal que exibem muitas características que estão em comum com os fibroblastos, tais como expressão de proteínas específicas, tal como, por exemplo, diversos tipos de colágenos. No entanto, FLS também secretam proteínas que estão normalmente ausentes em outras linhagens de fibroblastos, tais como, por exemplo lubricina. Além disto, FLS expressa moléculas que são importantes para a medição da adesão celular, tal como caderina-11, VCAM-1, diversas integrinas e seus receptores. Específica para os FLS é a expressão de CD55, e esta proteína é, portanto, usada tipicamente para identificar os FLS no sinóvio pela imunohistoquímica. Os FLS representam um tipo de célula especializada localizado no interior de articulações no sinóvio cujas células exercem uma função crucial na patogênese de doenças inflamatórias crônicas, tal como artrite reumatoide (RA). O termo “sinóvio reumatoide” ou “células sinoviais reumatoides” ou “tecido sinovial reumatoide” se refere ao sinóvio inflamado pelas articulações de um individual que sofre de RA. O sinóvio reumatoide é caracterizado por hiperplasia do forro íntimo e por acúmulo de FLS, células T, células plasmáticas, macrófagos, células B, células exterminadoras nutrais e células dendríticas no subforro sinovial. Estas células acumuladas são compreendidas na definição de células sinoviais reumatoides. Durante a progressão de RA, o tecido sinovial se torna um lugar em que processos inflamatórios constantes ocorrem, o que pode causar eventualmente danos à cartilagem e destruição e deformação da articulação. Relatou-se que os FLS que estão presentes no sinóvio durante RA exibem um fenótipo alterado em comparação ao FLS presentes nos tecidos normais. Por exemplo, os FLS no sinóvio reumatoide perdem “inibição por contato”, isto é, perdem a propriedade de impedir seu crescimento quando mais células entrem em contato uma com a outra. Além disto, à medida que perdem a dependência de crescer em superfície adesivas. Como resultado, aumenta o número de FLS no sinóvio com doença. A inflamação é intensificada adicionalmente pela produção de diversas moléculas de sinalização pró-inflamatória, particularmente interleucinas IL-6 e IL-8, prostanoídes e metaloproteinases em matriz (MMPs).

[037] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, um vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada de acordo com a invenção fornece para um aumento de pelo menos duas vezes na expressão do transgene em FLS humanos em comparação a um vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo não modificada, conforme definido no presente documento, de preferência, à proteína de capsídeo não modificada com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na SEQ ID NO: 13 a 19, quando testado sob as mesmas condições, em que, de preferência, a proteína de capsídeo não modificada tem o mesmo serotipo que a proteína de capsídeo modificada ou tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 19.

[038] Com mais preferência, o vírion de rAAV da invenção resulta em níveis aumentados de expressão do transgene mediante transdução *in vitro* conforme descrito acima em níveis aumentados de expressão em pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 vezes nas células de FLS humanos em comparação a um vírion de controle de rAAV.

[039] Igualmente preferencial, ou além do supracitado, o vírion de rAAV fornece expressão aumentada do transgene mediante a administração *in vivo* ao modelo de camundongo de bolsa de ar sinóvio (APS) (adaptado de Edwards et al (1981) J Pathol 134: 147-156, conforme descrito no exemplo 4) em comparação a um vírion de controle de rAAV, de preferência, em comparação a um vírion de rAAV que compreende proteínas de capsídeo wtAAV5, desde que o rAAV seja de outro modo idêntico (além de sua proteína de capsídeo (ou proteínas de capsídeo)). De preferência, expressão do transgene aumenta pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35 vezes com o uso de um rAAV que compreende as proteínas de capsídeo mutante do método da invenção. Um método exemplificativo é fornecido nos Exemplos.

[040] Também preferencial, ou além do supracitado, o vírion de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada fornece titulações de anticorpo neutralizante semelhante ou inferior (nAb) em comparação ao mesmo vírion de rAAV que compreende proteína de capsídeo de AAV não modificada, de preferência, do tipo selvagem do mesmo serotipo. Os capsídeos de WtAAV5 são

conhecidos por ter um perfil nAb atrativo, e portanto, são preferenciais titulações de nAb semelhantes ou inferiores de rAAV que compreendam uma proteína de capsídeo modificada de acordo com a presente invenção em comparação a wtAAV5.

[041] Alternativamente, o ensaio de transdução *in vitro* pode ser realizado, conforme descrito acima, porém num tipo celular/linhagem celular diferentes dos FLS, dependendo do tipo de célula que deve ser tido como alvo, tal como, por exemplo, em células selecionadas a partir do grupo que consiste em hepatócitos primários, linhagens celulares, *por exemplo*. HuH, HepG2, HepA1-6, células do coração, células de músculo esquelético, células pulmonares, tais como a linhagem celular A549, células de CNS, células oculares, células do trato gastrointestinal, células da medula óssea e células sanguíneas, tais como a linhagem celular THP-1. Isto também pode exigir um diferente serotipo AAV como controle preferencial, dependendo das proteínas de tropismo do capsídeo do tipo selvagem. De modo geral, um vetor de controle compreende, de preferência, proteínas de capsídeo do tipo selvagem que naturalmente têm como alvo o tecido de escolha. Conforme a pessoa versada na técnica observará, isto também pode depender do modo de administração: local sistêmica. Por exemplo, o AAV2, que foi o AAV examinado mais extensivamente, apresenta tropismo para as células de músculo esquelético, neurônios, células de músculo liso vascular e hepatócitos; o AAV6 apresenta tropismo para as células epiteliais de vias aéreas; o AAV7 apresenta tropismo para as células de músculo esquelético; o AAV8 apresenta tropismo para os hepatócitos; AAV1 e AAV5 apresentam tropismo para células endoteliais vasculares. Mediante a administração sistêmica, o AAV 1 a 3 e 5 a 9 têm tropismo para o fígado, com altos níveis de proteína observados com AAV9, 8, 7, 6, 1 e até um ponto menor de 5 e 2; o coração é submetido à transdução por AAV4, 6, 7, 8 e 9; expressão torácica é observada quanto ao AAV4 e 6 (Zincarelli et al (2008) Molecular Therapy 16(6): 1073-1080).

[042] Sem se ater a nenhuma teoria, acredita-se que a expressão aumentada obtida pelos vírions de rAAV que compreende uma proteína de capsídeo modificada da invenção em comparação a vírions de controle de rAAV é causada por uma transdução aprimorada da rAAV na célula, possivelmente por

tropismo alterado, resultando em (i) um número aumentado de células dentro da população celular que é submetida à transdução e/ou (ii) um nível aumentado de expressão por célula, por exemplo, devido à melhor absorção do vírion e/ou processamento intracelular.

[043] Outra vantagem do vírion de rAAV com uma proteína de capsídeo modificada de acordo com a invenção pode ser, de preferência, outros aprimoramentos, tais como possível evitação de anticorpos neutralizantes pré-existentes.

[044] Numa modalidade preferencial da presente invenção, a proteína de capsídeo modificada compreende uma sequência de aminoácidos Z, de preferência, a sequência de aminoácidos Z está compreendida na parte C-terminal da proteína. De preferência, a sequência Z tem 12 a 18 resíduos de aminoácidos de comprimento (também denominado no presente documento de “região de alça” e de “inserto”). Numa modalidade preferencial, a sequência Z está localizada na parte C-terminal da proteína de capsídeo, de preferência, numa localização correspondente a uma posição a 100 a 200, de preferência, 120 a 180, com mais preferência, 130 a 170, com mais preferência, 140 a 160, com máxima preferência, cerca de 150 aminoácidos da extremidade C da proteína de capsídeo do tipo selvagem, tais como, por exemplo, mostrado as SEQ ID NOs: 13 a 19. Os resíduos da sequência de aminoácidos Z são expostos, de preferência, na superfície da proteína de capsídeo, tal como, por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 resíduos são expostos na superfície da proteína de capsídeo (uma então chamada “alça”). Numa modalidade preferencial, a sequência Z tem comprimento de 14 a 18 resíduos de aminoácidos, com mais preferência, 15, 16, 17 ou 18 resíduos, com máxima preferência, 15, 17 ou 18 resíduos de aminoácidos de comprimento. A sequência Z pode substituir alguns resíduos de aminoácidos em comparação às sequências de proteínas de capsídeo não modificadas, tais como do tipo selvagem. De preferência, o inserto substitui 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos, com mais preferência, 6 ou 7 resíduos de aminoácidos da mesma sequência, porém sem o inserto, de preferência da sequência não modificada, com mais preferência, do tipo selvagem. Além da sequência Z/inserto, então na estrutura, a proteína de capsídeo pode compreender

modificações adicionais, tais como substituições de aminoácido (por exemplo, substituições de aminoácido conservativas), ou a proteína de capsídeo na estrutura pode ser a sequência de aminoácidos do tipo selvagem. O AAV na estrutura na qual o inserto está compreendido pode ser de qualquer serotipo, tal como, por exemplo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAVrh10 ou AAVDJ. De preferência, o AAV na estrutura na qual a sequência Z está compreendida é selecionada do grupo que consiste em AAV1, AAV2, AAV7, AAV9, AAVrh10, AAVDJ, com mais preferência, das proteínas de capsídeo não modificadas que tem uma sequência de aminoácidos, conforme mostrado em qualquer uma dentre a SEQ ID NO: 13 a 19. O inserto de acordo com a invenção está compreendido, de preferência, na parte C-terminal da proteína de capsídeo, de preferência, numa localização correspondente a 100 a 200, de preferência, 120 a 180, com mais preferência, 130 a 170, com mais preferência, 140 a 160, com máxima preferência, aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos da extremidade C DA proteína de capsídeo do tipo selvagem, tal como, por exemplo, mostradas nas SEQ ID NOs: 13 a 19, em que a localização do inserto é representada pela fórmula II:

$$EEEIxxxxPVATExxGxxxxNxQy - Z - (x)_nLPGMVWQxRDVYLQGPIWAKIPHTDG$$

[045] em que x representa um único resíduo de aminoácido, em que y representa 0, 1 ou 2 resíduos de aminoácido (ou resíduos de aminoácido) (que, então, pode estar ausente), e em que n é 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, de preferência, 8, 9 ou 10 ou em que a localização do inserto é representada por uma sequência que tem pelo menos 90, 93, 95, 96, 97, 98 ou 99% identidade de sequência com a fórmula II. De preferência, os últimos três resíduos de aminoácidos que antecedem a extremidade N-terminal da sequência Z da invenção são NLQ, NHQ ou NFQ. De preferência, y representa 0 ou 2 resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, y representa 2 resíduos de aminoácidos, deste modo, os resíduos de aminoácidos adicionais, de preferência, dois resíduos de serinas, podem estar presentes entre o motivo NxQ e o inserto da invenção. Este é, de preferência, o caso em que o motivo NxQ é NFQ, por exemplo, caso o capsídeo de AAV seja uma sequência de capsídeos AAV1, conforme representado na SEQ ID NO:1. A pessoa versada na técnica poderá determinar estes motivos e

esta região na qual o inserto está localizado e, também, se abriga algumas variações, tais como substituições de aminoácido ou deleções, que também estão abrangidas no escopo da presente invenção.

[046] Numa modalidade preferencial, com base nos alinhamentos mostrados nas Figuras 4 e 5, o inserto (sequência Z) compreende ou consiste numa sequência da fórmula: $x_1\text{-G-Q-}x_2\text{-G-}x_3\text{-}x_4\text{-}x_5\text{-R-}x_6\text{-}x_7\text{-}x_8\text{-}x_9\text{-}x_{10}\text{-}x_{11}\text{-}x_{12}\text{-}x_{13}\text{-}x_{14}\text{-}x_{15}$, em que x_1 é Q ou nenhum, x_2 é S ou R, x_3 é N ou C, x_4 é D, Y ou E, x_5 é C, V, S ou A, x_6 é G, S ou V, x_7 é nenhum, A, V ou R, x_8 é D, N ou E, x_9 é C ou A, x_{10} é F ou Q, x_{11} é nenhum, C ou A, x_{12} é nenhum ou A, x_{13} é nenhum ou Q, x_{14} é nenhum ou A e x_{15} é nenhum ou A. alternativamente, o inserto (sequência Z) compreende ou consiste numa sequência da fórmula: $y_1\text{-G-Q-}y_2\text{-G-}y_3\text{-}y_4\text{-}y_5\text{-R-}y_6\text{-}y_7\text{-}y_8\text{-}y_9\text{-}y_{10}\text{-A-}y_{11}\text{-}y_{12}\text{-}y_{13}$, em que y_1 é Q ou nenhum, y_2 é S ou R, y_3 é N ou C, y_4 é D, Y ou E, y_5 é C, V, S ou A, y_6 é G, S ou V, y_7 é nenhum ou D, y_8 é nenhum ou C, y_9 é A, V, R ou F, y_{10} é N, D, E ou C, y_{11} é nenhum ou Q, y_{12} é nenhum ou A, y_{13} é nenhum ou A. Em mais uma alternativa, a modalidade mais preferencial, com base nos alinhamentos mostrados nas Figuras 6 e 7, o inserto (sequência Z) compreende ou consiste numa sequência da fórmula geral I:



[047] em que x representa um único resíduo de aminoácido e em que y representa 0, 1 ou 2 resíduos de aminoácidos (que pode estar, então, ausente). De preferência, (i) caso na extremidade N y representa 0 aminoácidos, então, o outro y dentro da fórmula I representa 0 resíduos de aminoácidos ou (ii) caso na extremidade N, y representa 1 resíduo de aminoácido, então, o outro y na fórmula I representa 2 resíduos de aminoácidos. Com mais preferência, o inserto (sequência Z) compreende ou consiste numa sequência da fórmula mais específica:



[048] em que z_0 é nenhum ou Q, z_1 é R ou S, z_2 é C ou N, z_3 é D, E ou Y, z_4 é C, A, S ou V, z_5 é G, V ou S, z_6 é d ou nenhum, z_7 é C ou nenhum, z_8 é F, R, V ou A, z_9 é C, D, N ou E. Com mais preferência, caso z_0 seja nenhum, então, tanto z_6 quanto z_7 também representam nenhum.

[049] Com mais preferência, a sequência Z/inserto compreende ou consiste

numa sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%, com máxima preferência, 100% de identidade de sequência com qualquer uma das sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8 – 12. É preferencial que a sequência Z/inserto compreenda ou consista numa sequência de aminoácidos representada por uma dentre as fórmulas acima e que tenha pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%, com máxima preferência 100% de identidade de sequência com qualquer uma dentre as sequências de aminoácidos selecionadas a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 8 a 12.

[050] Nas células de mamíferos, a expressão das três proteínas de capsídeo de AAV (VP1, VP2 e VP3) na estequiometria correta depende de uma combinação do uso alternativo de dois sítios aceitadores de splicing e da utilização subideal de um códon de iniciação de ACG para VP2 que não é precisamente reproduzida por células de inseto. A estequiometria correta é importante para ineficácia das partículas de AAV. Para a produção das três proteínas de capsídeo de AAV nas células de inseto na estequiometria correta, é comum na técnica usar um construto que é transcrito num único mensageiro policistrônico que possa expressar todas as três proteínas de VP sem que o splicing seja necessário. A fim de obter isto, a proteína VP1 pode estar sob o controle de um códon de iniciação de tradução subideal em vez de ATG. Exemplos de tal códon de iniciação de tradução subideal são ACG, TTG, CTG e GTG (Urabe et al. (2002) Human Gene Therapy 13: 1935-1943; US 20030148506; US 20040197895; WO 2007/046703). Alternativamente, na produção de rAAV em células de inseto um cassete de ácido nucleico pode ser usado para expressar proteínas VP1, VP2 e VP3, sendo que estas proteínas são codificadas por uma sequência de ácido nucleicos que compreendem quadros de leitura aberta em sobreposição (ORFs), conforme descrito na patente EP nº 2,061,891 B1 na qual é divulgado um cassete de expressão de VP que compreende um íntron que compreende um promotor antes do códon de iniciação de ACG de VP2. A proteína de capsídeo modificada da invenção é definida com relação à sequência de proteínas da proteína de capsídeo VP1. No entanto, visto que a sequência Z/inserto está localizada na parte C-terminal da proteína VP1, é abrangido pela invenção o fato de que as proteínas

VP2 e VP3 também abrigam a sequência Z/inserto e, então, são modificadas (independentemente do método de produção de rAAV, tal como, por exemplo nas células de inseto ou nas células de mamíferos).

[051] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, a proteína de capsídeo modificada de acordo com A invenção compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em: i) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência que tem 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tenha SEQ ID NO: 1 e em que os aminoácidos nas posições 588 a 602 da SEQ ID NO: 1 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência têm 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 11, ii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência que tem 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tenha SEQ ID NO: 2 e em que os aminoácidos nas posições 585 a 599 da SEQ ID NO: 2 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência que tem 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 10, iii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, tem 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tenha SEQ ID NO: 3 e em que os aminoácidos nas posições 587 a 601 da SEQ ID NO: 3 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência que tem 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 9, iv) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tenha SEQ ID NO: 4 e em que os aminoácidos nas posições 586 a 600 da SEQ ID NO: 4 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 8, v) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com uma

sequência de aminoácidos que tenha SEQ ID NO: 5 e em que os aminoácidos nas posições 588 - 602 da SEQ ID NO: 5 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência que tem 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 9, vi) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tenha a SEQ ID NO: 6 e em que os aminoácidos nas posições 588 a 602 da SEQ ID NO: 6 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com SEQ ID NO: 8, e vii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70, 75, 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tenha SEQ ID NO: 7 e em que os aminoácidos nas posições 587 a 601 da SEQ ID NO: 7 têm pelo menos 80, 85, 87, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, com máxima preferência, que tem 100% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 12. De preferência, o AAV na estrutura proteína de capsídeo na qual o inserto está compreendido tem a sequência de aminoácidos de um capsídeo de AAV do tipo selvagem, tal como, por exemplo, de AAV5, AAV1, AAV2, AAV7, AAV9, AAVrh10 ou AAVDJ ou uma sequência de aminoácidos que compreende substituições de aminoácido conservativas. Com mais preferência, o AAV na estrutura proteína de capsídeo na qual o inserto está compreendido, tem a sequência de aminoácidos de um wtAAV5 capsídeo ou uma sequência de aminoácidos que compreende substituições de aminoácido conservativas.

[052] “Identidade de sequência” é definida no presente documento como uma relação entre duas ou mais sequências de aminoácidos (polipeptídeo ou proteína) ou duas ou mais sequências de ácido nucleicos (polinucleotídeo), conforme determinado comparando-se as sequências. Numa modalidade preferencial, a identidade de sequência é calculada com base no comprimento total de duas determinadas SEQ ID NO ou em parte das mesmas. Parte das mesmas significa, de preferência, pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% ou 100% de ambas as SEQ ID NO. Na técnica, “identidade” também significa o grau de relação de sequência entre sequências de aminoácidos ou de ácidos nucleicos,

conforme o caso, conforme determinado pelo pareamento entre colunas de tais sequências. Salvo quando indicado de outro modo no presente documento, identidade ou semelhança com uma determinada SEQ ID NO significa identidade ou semelhança com base no comprimento completo da dita sequência (*isto é*, em seu comprimento inteiro ou como um todo).

[053] “Semelhança” entre duas sequências de aminoácidos é determinado comparando-se a sequência de aminoácidos e seus substitutos de aminoácidos conservados de um polipeptídeo à sequência de um segundo polipeptídeo. “Identidade” e “semelhança” podem ser prontamente calculadas por métodos conhecidos, incluindo, porém sem limitação aqueles descritos em (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., edição, Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., edição, Academic Press, Nova Iorque, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., edições, Humana Press, Nova Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; e Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., edições., M Stockton Press, Nova Iorque, 1991; e Carillo, H., e Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988)).

[054] Os métodos preferenciais para determinar a identidade são elaborados para fornecer o maior pareamento entre as sequências testadas. Métodos para determinar a identidade e semelhança são codificados em programas de computador disponíveis publicamente. Os métodos de programa de computador preferenciais para determinar identidade e semelhança entre duas sequências incluem *por exemplo*, o pacote de programa de GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN, e FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). O programa BLAST X está publicamente disponível junto ao NCBI e outras fontes (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). O algoritmo Smith Waterman também pode ser usado para determinar identidade.

[055] Os parâmetros preferenciais para comparação de sequência de polipeptídeo incluem o seguinte Algoritmo: Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparação: BLOSSUM62 de Hentikoff e Hentikoff,

Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 89:10915-10919 (1992); Penalidade para Lacunas: 12; e Penalidade para Comprimento de Lacunas: 4. Tal programa está publicamente disponível como o programa "Ogap" da Genetics Computer Group, localizada em Madison, WI. Os parâmetros mencionados acima são os parâmetros padrão para comparações de aminoácido (junto de sem penalidade para lacunas finais).

[056] Os parâmetros preferenciais para comparação de ácido nucleico incluem o seguinte Algoritmo: Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparação: pareamentos=+10, maus pareamentos=0; Penalidade Para Lacunas: 50; Penalidade para Comprimentos de Lacunas: 3. Disponível como o programa Gap da Genetics Computer Group, localizado em Madison, Wis (www.biology.wustl.edu/gcg/gap). Foram fornecidos acima os parâmetros padrão para comparações de ácido nucleico.

[057] Opcionalmente, na determinação do grau de semelhança de aminoácido, a pessoa versada na técnica também pode considerar substituições de aminoácido então chamadas "conservativas", conforme ficará para a pessoa versada na técnica. Substituições de aminoácido conservativas se intercambiabilidade de resíduos que têm cadeias laterais semelhantes similar. Por exemplo, um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais alifáticas de hidroxila é serina e treonina; um grupo de aminoácidos que tem cadeias laterais que contêm amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos que têm cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos que tem cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos que tem cadeias laterais que contêm enxofre é cisteína e metionina. Os grupos preferenciais de substituição conservativa de aminoácido são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina e asparagina-glutamina. As variantes de substituição da sequência de aminoácidos divulgadas no presente documento são aquelas em que pelo menos um resíduo nas sequências divulgadas foi removido e um diferente resíduo inserido em seu lugar. De preferência, a mudança de aminoácido é conservativa. As substituições conservativas preferenciais para cada um dos aminoácidos de ocorrências natural são conforme o seguinte: Ala para Ser; Arg

para Lys; Asn para Gln ou His; Asp para Glu; Cys para Ser ou Ala; Gln para Asn; Glu para Asp; Gly para Pro; His para Asn ou Gln; Ile para Leu ou Val; Leu para Ile ou Val; Lys para Arg; Gln ou Glu; Met para Leu ou Ile; Phe para Met, Leu ou Tyr; Ser para Thr; Thr para Ser; Trp para Tyr; Tyr para Trp ou Phe; e, Val para Ile ou Leu.

[058] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, a proteína de capsídeo compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:1 – 7, com mais preferência, a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 6 e 7, com ainda mais preferência, a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 3, 4 e 6, ainda com mais preferência, a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 4 e 6, com máxima preferência, SEQ ID NO:4.

[059] As sequências de ITR funcionais são necessárias para a replicação, regaste e empacotamento de vírions rAAV. As sequências de ITR podem ser sequências do tipo selvagem ou podem ter pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% de identidade de sequência com sequências do tipo selvagem ou podem ser alteradas, por exemplo, por inserção, mutação, deleção ou substituição de nucleotídeos, desde que permaneçam funcionais. Neste contexto, a funcionalidade se refere à capacidade de empacotar diretamente o genoma no envoltório do capsídeo e, em seguida, permitir que a expressão na célula hospedeira seja submetida à transdução ou célula-alvo. Tipicamente, as ITRs do genoma de AAV do tipo selvagem estão retidas no vetor de rAAV. As ITRs podem ser clonadas do genoma viral de AAV ou excisado de um vetor que compreende as ITRs de AAV. As sequências de nucleotídeos de ITR podem ser ligadas em qualquer extremidade a um transgene, conforme definido no presente documento, com o uso de técnicas de biologia molecular padrão, ou a sequência de AAV do tipo selvagem entre as ITRs pode ser substituída pela sequência de nucleotídeos desejada. O vetor de rAAV compreende, de preferência, pelo menos as sequências de nucleotídeo das regiões de ITR de um dentre os serotipos de AAV ou as sequências de nucleotídeo substancialmente idênticas aos mesmos, e pelo menos uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína terapêutica (sob o controle de um elemento

regulador adequado) inserido entre as duas ITRs. A maioria dos vetores de rAAV usados atualmente usa as sequências de ITR do serotipo de AAV 2. A maioria das ITRs presentes num vetor de rAAV é do serotipo de AAV2. Outras ITRs preferenciais são do serotipo de AAV1, AAV3, AAV5 ou AAV6 (Grimm et al. (2006) J Virol 80(1):426-439). Um genoma de rAAV pode compreender DNA de fita simples ou de dupla fita (autocomplementar). A molécula de ácido nucleico de fita simples é de fita senso ou antissenso, uma vez que ambas as polaridades podem ser igualmente empacotadas em capsídeos de AAV. Os vetores de rAAV de fita simples podem utilizar as sequências de ITR de serotipo de AAV 2 (AAV2) do tipo selvagem, e os vetores de rAAV de dupla fita (autocomplementar) podem utilizar uma versão modificada das ITRs. Alternativamente, numa modalidade, um vetor de dupla fita compreende uma ITR, sendo que a ITR é do AAV4. O vetor de rAAV pode compreender adicionalmente um marcador ou gene repórter, tal como um gene, por exemplo, que codifica um gene de resistência antibiótica, uma proteína fluorescente (*por exemplo, gfp*) ou um gene que codifica um produto detectável e/ou selecionável de modo químico, enzimático ou de outro modo (*por exemplo, lacZ*, fosfatase alcalina (AP), SEAP, Luc, Neo, Bla etc.) conhecida na técnica.

[060] O vetor de rAAV, incluindo qualquer combinação possível do capsídeo de serotipo de AAV e ITRs de genoma de AAV, é produzido com o uso dos métodos conhecidos na técnica, por exemplo, com o uso de um sistema de produção de rAAV de mamífero ou um sistema de produção de rAAV de célula de inseto. Os métodos conhecidos na técnica são descritos, por exemplo, em Pan et al. (J. of Virology (1999) 73: 3410-3417), Clark et al. (Human Gene Therapy (1999) 10: 1031-1039), Wang et al. (Methods Mol. Biol. (2011) 807: 361-404), Grimm (Methods (2002) 28(2): 146-157), e o sistema de células de inseto com base em Urabe et al (Human Gene Therapy (2002) 13:1935-1943), Kohlbrenner et al (Molecular Therapy (2005) 12(6):1217-1225), publicação de Patente Internacional WO 2007/046703, publicação de Patente Internacional WO 2007/148971, publicação de Patente Internacional WO 2009/014445, publicação de Patente Internacional WO 2009/104964, publicação de Patente Internacional WO 2009/154452, publicação de Patente Internacional WO 2011/112089, publicação de Patente Internacional WO 2013/036118, Patente US nº 6.723.551 B, que são incorporados

no presente documento a título de referência. Em suma, os métodos podem envolver geralmente (a) a introdução do construto de genoma de rAAV numa célula hospedeira, (b) a introdução de um construto auxiliar de AAV na célula hospedeira, em que o construto auxiliar compreende as funções virais ausentes do genoma de rAAV do tipo selvagem e (c) a introdução de um construto de vírus auxiliar na célula hospedeira. Todas as funções para a replicação e empacotamento de vetor de rAAV precisam estar presentes a fim de obter a replicação e empacotamento do genoma de rAAV em vetores de rAAV. A introdução na célula hospedeira pode ser realizada com o uso de técnicas de biologia molecular padrão e pode ocorrer de maneira simultânea ou sequencial. Por fim, as células hospedeiras são cultivadas para produzir vetores de rAAV que são, em seguida, purificados com o uso de técnicas padrão, tais como gradientes de CsCl (Xiao et al. 1996, J. Virol. 70: 8098-8108) ou purificação de Iodixanol. Em seguida, o vetor de rAAV purificado está tipicamente pronto para uso nos métodos. Altas titulações não superiores a 10^{12} partículas por ml e alta pureza (livres de vírus auxiliar e do tipo selvagem detectável) podem ser obtidas (consultar, por exemplo Clark et al. *supra* e Flotte et al. 1995, Gene Ther. 2: 29-37). O tamanho total do transgene inserido no vetor de rAAV entre as regiões de ITR é geralmente menor que 5 quilobases (kb).

[061] No contexto da presente invenção, a proteína de envoltório do capsídeo pode ter um serotipo diferente do genoma de rAAV, que compreende (i) uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse e (ii) pelo menos uma sequência de ITR de AAV. Deste modo, um genoma rAAV da invenção pode ser encapsidado por uma proteína de envoltório do capsídeo da presente invenção, *isto é*, o capsídeo icosaédrico, que compreende proteínas de capsídeo (VP1, VP2, e/ou VP3) de acordo com a presente invenção, *por exemplo*, mutantes de proteínas de capsídeo de AAV de acordo com a invenção, ao passo que as sequências de ITRs contidos neste vetor de rAAV podem ser qualquer um dos serotipos de AAV descritos acima, incluindo, por exemplo AAV2 ou AAV5. Numa modalidade, o genoma de rAAV ou as ITRs presentes no vírion de rAAV são derivados do serotipo de AAV 2 ou serotipo de AAV 5 ou serotipo de AAV 8. O genoma completo de AAV5 e outros serotipos de AAV foram sequenciados (Chiorini et al. 1999, J. of Virology Vol. 73, No.2, p1309-1319) e a sequência de nucleotídeos

de AAV5 está disponível em GenBank (Número de Acesso AF085716). As sequências de nucleotídeos de ITR de AAV2 e AAV5 estão, prontamente, disponíveis para a pessoa versada na técnica. O genoma completo de AAV2 está disponível no NCBI (Sequências de Referência do NCBI NC_001401.2). As sequências podem ser ou clonadas ou produzidas por síntese química, conforme conhecido na técnica, com o uso, por exemplo, um sintetizador de oligonucleotídeo, conforme fornecido, *por exemplo*, pela Applied Biosystems Inc. (Fosters, CA, EUA) ou por técnicas de biologia molecular padrão.

[062] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, o vetor de rAAV compreende uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse.

[063] Os termos “transgene” ou “produto gênico de interesse” são usados de maneira intercambiável no presente documento e se referem a um ácido nucleico não nativo com relação à sequência de ácido nucleico de AAV. Estes termos são usados para se referir a um polinucleotídeo que possa ser introduzido numa célula ou organismo. Os produtos gênicos de interesse incluem qualquer polinucleotídeo, tal como um gene que codifica um polipeptídeo ou proteína, um polinucleotídeo que é transcrito num polinucleotídeo inibidor ou um polinucleotídeo que não é transcrito (*por exemplo*, não tem um elemento de controle de expressão, tal como um promotor que aciona a transcrição). Um produto gênico de interesse da invenção pode compreender pelo menos duas sequências de nucleotídeo que são, cada um, diferentes ou que codificam diferentes moléculas terapêuticas. As pelo menos duas sequências de nucleotídeo diferentes podem ser ligadas por um elemento de IRES (sítio de entrada de ribossoma interno), fornecendo uma transcrição bicistrônica sob controle de um único promotor. Os elementos IRES são descritos, *por exemplo*, em Hsieh et al. (1995, Biochem. Biophys. Res. Commun. 214:910-917). Além disto, as pelo menos duas sequências de nucleotídeo diferentes que codificam diferentes polipeptídeos (terapêuticos) ou proteínas podem ser ligadas por uma sequência viral 2A para permitir expressão eficiente de ambos os transgenes de um único promotor. Os exemplos de sequências 2A incluem aquelas de vírus de doença de pé e de mão, vírus da rinite equina A. Vírus

thosea asigna e teschovírus-1 suíno (Kim et al., PLoS One (2011) 6(4): e18556). Um produto gênico de interesse é inserido, de preferência, no genoma de rAAV ou entre sequências de ITR. Um produto gênico de interesse também pode ser um construto de expressão que compreende um elemento regulador de expressão, tal como um promotor ou sequência reguladora de transcrição ligado de maneira operacional a uma sequência de codificação e uma sequência de terminação 3'. O produto gênico de interesse pode ser um alelo mutante funcional que substitui ou suplementa um alelo com defeito. A terapia gênica também inclui a inserção de transgenes que são de natureza inibidora, isto é, que inibe, diminui ou reduz a expressão, atividade ou função de um gene ou proteína endógeno ou exógeno, tais como um gene ou proteína indesejável ou aberrante (*por exemplo*, patogênico). Tais transgenes podem ser exógenos. Entende-se que uma molécula ou sequência exógena é uma molécula ou sequência que não ocorre normalmente na célula, tecido e/ou no indivíduo a ser tratado. Tanto doenças adquiridas quanto congênicas são tratáveis por terapia gênica.

[064] “Gene” ou “sequência de codificação” se refere a uma região de DNA ou RNA que “codifica” uma proteína particular. Uma sequência de codificação é transcrita (DNA) e traduzida (RNA) num polipeptídeo quando colocado sob o controle de uma região reguladora adequada, tal como um promotor. Um gene pode compreender diversos fragmentos ligados de maneira operacional, tal como um promotor, uma sequência líder 5', um íntron, uma sequência de codificação e uma sequência não traduzida 3', que compreende um sítio de poliadenilação ou uma sequência sinal. Um gene quimérico ou recombinante é um gene não encontrado normalmente na natureza, tal como um gene em que, por exemplo, o promotor não tem natureza associada à parte ou a toda a região do DNA transcrito. “Expressão de um gene” se refere ao processo em que um gene é transcrito num RNA e/ou traduzido numa proteína ativa.

[065] Conforme usado no presente documento, o termo “promotor” ou “sequência reguladora de transcrição” se refere a um fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar a transcrição de uma ou mais sequências de codificação, e está localizado a montante com relação à direção de transcrição do sítio de iniciação de transcrição da sequência de codificação, e é estruturalmente

identificado pela presença de um sítio de ligação para polimerase de RNA dependente de DNA, sítios de iniciação de transcrição e quaisquer sequências de DNA, incluindo, porém sem limitação, sítios de ligação de fator de transcrição, sítios de ligação de proteína de repressor e ativador e quaisquer outras sequências de nucleotídeos conhecidas por uma pessoa versada na técnica para atuar direta ou indiretamente para regular a quantidade de transcrição do promotor. Um promotor “constitutivo” é um promotor que está ativo na maioria dos tecidos sob condições mais fisiológicas e de desenvolvimento. Um promotor “induzível” é um promotor que é regulado de maneira fisiológica e por desenvolvimento, *por exemplo*, pela aplicação de um indutor químico. Um promotor induzível preferencial é um promotor responsivo a NF- κ B que é induzível mediante inflamação. Um promotor “tecido-específico” está ativo, de preferência, em tipos específicos de tecidos ou células. A seleção de uma sequência de promotor adequada depende geralmente da célula hospedeira para a expressão de um segmento de DNA. As sequências de promotor preferencial dentro do rAAV e/ou do transgene da invenção são promotores que conferem expressão em células do sinóvio reumatoide, tal como em macrófagos íntimos e/ou em FLS e/ou outras células sinoviais, tais como, porém sem limitação, células T. Os promotores preferenciais são, por exemplo, os promotores de genes conhecidos por serem expressos em células sinoviais, tais como o promotor CMV, o promotor do gene IL-6 ou o promotor SV40 ou um promotor induzível por NF- κ B, conforme identificado anteriormente no presente documento e outros, conforme determinado prontamente pela pessoa versada na técnica. Alternativamente, um transgene é ligado operacionalmente a um promotor que permite expressão sistêmica eficiente. As sequências de promotores adequadas são promotor de CMV, CBA (beta-actina de frango), ou promotores fígado-específicos, tais como alfa-1 anti-Tripsina humana (hAAT) ou TBG (globulina de ligação à tiroxina). De preferência, o promotor dentro do rAAV e/ou transgene não é um promotor induzível por esteroide. Com mais preferência, o promotor dentro do rAAV e/ou transgene não é promotor induzível por dexametasona.

[066] Conforme usado no presente documento, o termo “ligado de maneira operacional” se refere a uma ligação de elementos de polinucleotídeo (ou polipeptídeo) numa relação funcional. Um ácido nucleico é “ligado de maneira

operacional” quando é colocado numa relação funcional com outras sequências de ácido nucleicos. Por exemplo, uma sequência reguladora de transcrição é ligada de maneira operacional a uma sequência de codificação, caso isto afete a transcrição da sequência de codificação. “Ligado(a) de maneira operacional” significa que as sequências de DNA que são ligadas são tipicamente contíguas e, quando necessário, para unir duas regiões de codificação de proteína, contíguas e no quadro de leitura.

[067] Um “produto gênico de interesse” pode ser um “polipeptídeo terapêutico” ou “proteína terapêutica” que devem ser entendidos no presente documento como um polipeptídeo ou proteína que podem ter um efeito benéfico num indivíduo, de preferência, o dito indivíduo é um ser humano, com mais preferência, o dito ser humano apresenta uma doença. Tal polipeptídeo terapêutico pode ser selecionado, porém sem limitação, a partir do grupo que consiste numa enzima, um cofator, uma citocina, um anticorpo, um fator de crescimento, um hormônio e uma proteína anti-inflamatória.

[068] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, a sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse está localizada entre duas sequências de ITR de AAV. Dito de outro modo, a sequência de nucleotídeos que codifica o produto gênico de interesse é flanqueada por duas sequências de ITR de AAV, isto é, uma ITR em qualquer extremidade da sequência de nucleotídeos que codifica o produto gênico de interesse.

[069] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial, o produto gênico de interesse trata, previne ou suprime sintomas associados a uma doença artrítica, em que preferencialmente o produto gênico de interesse é selecionado do grupo que consiste em interleucinas, moduladores imunes, anticorpos, shRNA, miRNA, fatores de crescimento, proteases, nucleotidasas/nucleosidasas, peptídeos, inibidores de protease, inibidores, enzimas e combinações dos mesmos, e em que mais preferencialmente o produto gênico de interesse é pelo menos um dentre CD39, CD73 e IFN- β . Os exemplos destes são: interleucina1 (IL-1) inibidor (por exemplo, anakinra, canakinumab, rilonacept), inibidor de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) (por

exemplo, etanercept, infliximab, adalimumab, certilimumab pegol, golimumab), antagonista de receptor IL-1, receptor de IL-1 solúvel, inibidor IL-17 (por exemplo, secuquinumab, brodalumab, ixequizumab, IL-12/IL-23 inibidor (ustequinumab, risanquizumab, guselquumab, tildraquizumab), inibidor de coestímulo de célula T (por exemplo, abatacept), agentes de depleção e de inibição de célula B e agentes de inibição (por exemplo, rituximab, belimumab, ianalumab, tabalumab), Inibidor de IL-15 (por exemplo, AMG-714), inibidor de IL-22 (por exemplo, Fezaquunimab), inibidor de GM-CSF (lenzilumab, namilumab) fator de crescimento do tipo insulina(IGF-1), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (por exemplo, rhFGF-18/sprifermina), ativador de receptor de inibidor de ligante quappa-B de fator nuclear (RANQUL) (por exemplo, denosumab), inibidor de complemento 5a (por exemplo, C5aR-151), membro da família da proteína morfogenética óssea (BMPs), fator de crescimento-beta de transformação (TGF- β), família de fator de diferenciação de crescimento (GDFs), inibidor de interleucina-18 (por exemplo, proteína de ligação Tadekinig alfa/IL-18), inibidores de IL-2 (por exemplo, basiliximab, daclizumab), receptor p55 de TNF α solúvel (sTNF α) ou receptor p75 de sTNF α , receptores de sTNF α fusionados com uma IgG, inibidores de receptor p55 de TNF α , inibidores de receptor p75 de sTNF α , I κ B-quinase negativa dominante (dn-IQUQU- β), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10) (F8IL10/Dequavil), interleucina-13 (IL-13), interferon beta (IFN- β), tecido inibidor da família MMP (TIMPs), inibidor ativador de plasminogênio (PAIs), inibidores de serina protease (serpinas), moléculas de sinalização/fatores de transcrição (*por exemplo*, SMAD, Sox9, I κ B), componentes de matriz extracelular (*por exemplo*, colágeno, proteína de matriz oligomérica de cartilagem (COMP), proteoglicanos, elastina), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), Grupamento de Diferenciação 39 (CD39) e Grupamento de Diferenciação 73 (CD73), Superóxido dismutase (SOD) e combinações dos mesmos.

[070] Sistemas funcionais de edição de genoma para uso em todas as modalidades da invenção são conhecidas pelas pessoas versadas na técnica e incluem: Nucleases Efetoras do Tipo Ativador de Transcrição (TALENs, Gaj et al. (2013) Trends Biotechnol. 31(7):397-405), nucleases de dedo de zinco (ZFNs, Gaj et al. (2013) *supra*), meganucleases, tais como I-SceI (Arnould et al. (2007) J Mol

Biol 371(1):49-65; Takeuchi et al. (2011) PNAS USA 108(32):13077-13082), sistemas de endonuclease guiada por RNA como CRISPR/Cas (Mali et al. (2013) Nat Methods 10(10):957-963; Mali et al. (2013) Nat Biotechnol 31(9):833-838; Cong et al. (2013) Science 339(6121):819-823) e CRISPR/Cpf1 (Zetsche et al. (2015) Cell 163(3):759-771), moléculas formadoras de triplex, poliamidas sintéticas e proteínas modeladoras de dedo de zinco (Uil et al. (2003) Nucleic acids Res 31(21):6064-6078). Os sistemas funcionais de edição de genoma empregam nucleases que criam rupturas dupla fita sítio-específicas em localizações desejadas no genoma. As rupturas de dupla fita induzidas são reparadas por meio de recombinação homóloga ou não homóloga de união de extremidades. Como resultado, as mutações tidas como alvo são obtidas. É vantajoso substituir um gene com defeito (causando uma doença ou distúrbio) com um alelo normal em sua localização natural por qualquer um destes métodos, devido ao fato de que não exige que as sequências de codificação completas e sequências reguladoras sejam incluídas no vírion de rAAV quando apenas uma pequena porção do gene precisa ser alterada. Considera-se, também, que a expressão do gene substituído parcialmente é mais consistente com biologia celular normal do que os genes completos que são transportados por vírions. O sistema preferencial de edição de gene é o CRISPR (que compreende CRISPR/Cpf1 e CRISPR-Cas), devido ao fato de que é mais rápida e menos dispendioso que outros métodos. Uma grande vantagem também é o fato de que CRISPR pode ter seu propósito facilmente recalculado para ter como alvo diferentes sequências DNA com o uso dos únicos RNAs guia de CRISPR. Deste modo, alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, a genoma de rAAV compreende pelo menos um dentre: (i) um polinucleotídeo que compreende uma sequência que codifica pelo menos um RNA guia (gRNA); em que a RNA guia é substancialmente complementar – de preferência complementar – a uma sequência-alvo de polinucleotídeo (ou sequências-alvo de polinucleotídeo) num genoma; e (ii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência que codifica uma nuclease; em que a nuclease forma um complexo de ribonuclease com o RNA guia, e em que o complexo de ribonuclease causa rupturas de DNA dupla fita sítio-específico no genoma.

[071] Num segundo aspecto, a presente invenção se refere a uma composição de rAAV para uso no tratamento, prevenção ou supressão de sintomas associados a uma doença artrítica, em que a composição de rAAV compreende um vírion de rAAV da invenção e um carreador, diluente, solubilizante, carga, conservante e/ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis, de preferência, um carreador farmacêuticamente aceitável. Tal carreador, diluente, solubilizante, carga, conservante e/ou excipiente farmacêuticamente aceitáveis podem, por exemplo, ser encontrados em Remington: The Science e Practice of Pharmacy, 20ª Edição. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Qualquer carreador, diluente, solubilizante, carga, conservante e/ou excipiente adequados farmacêuticamente aceitáveis pode ser usado nas presentes composições (Consultar, *por exemplo*, Remington: The Science e Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, abril de 1997). As formas farmacêuticas preferenciais são combinadas com solução salina estéril, solução de dextrose ou solução tamponada ou outros fluídos estéreis farmacêuticamente aceitáveis. Alternativamente, um carreador sólido pode ser usado, tal como, por exemplo, microesferas de microcarreador.

[072] Composições farmacêuticas são tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenamento. As composições farmacêuticas podem estar formuladas como uma solução, microemulsão, lipossoma ou outra estrutura ordenada adequada para acomodar alta concentração de fármaco. O carreador pode ser um solvente meio de dispersão que contém, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido e semelhante) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, com o uso de um revestimento, tal como lecitina, pela manutenção da partícula necessária no caso de dispersão e com o uso de tensoativos. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada do das composições injetáveis pode ocorrer por meio da inclusão na composição de um agente que atrasa absorção, por exemplo, sais e gelatina de monoestearato. O vírion parvoviral pode ser administrado como um bolo ou numa formulação de liberação controlada, por

exemplo, numa composição que inclui um polímero de liberação lenta ou outros carreadores que protegerão o composto contra liberação rápida, incluindo implantes e sistemas de entrega microencapsulados. Polímeros biodegradáveis biocompatíveis podem ser usados, por exemplo, acetato de etileno vinílico, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoestéres, ácido poliláctico e copolímeros poliláticos poliglicólicos (PLG). Conforme usado no presente documento, “carreador farmacologicamente aceitável” ou “excipiente” inclui, de preferência, qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de atraso de absorção e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Os carreadores farmacologicamente aceitáveis incluem, soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporâneas de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais mídias e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é bem conhecido na técnica. No entanto, desde que quaisquer meios ou agentes convencionais sejam incompatíveis com o composto ativo, o uso dos mesmos nas composições farmacêuticas da invenção é contemplado.

[073] Pode ser vantajoso formular composições parenterais em forma unitária de dosagem para facilidade de administração e uniforme de dosagem. “Forma unitária de dosagem”, conforme usado no presente documento se refere a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para indivíduos a serem tratados; sendo que cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado associado ao carreador farmacêutico exigido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção pode ser ditada pelas características exclusivas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser obtido e pelas limitações inerentes na técnica de composição, tal como o composto ativo para o tratamento de uma afecção em indivíduos.

[074] Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições farmacêuticas da invenção. A orientação na coadministração de produtos terapêuticos adicionados pode ser encontrada, por exemplo, no Compêndio de Produtos Farmacêuticos e Especialidades (CPS) da Canadian Pharmacists Association.

[075] Numa modalidade, a composição de rAAV compreende adicionalmente partículas vazias (*isto é*, partículas com apenas capsídeo, logo, não compreendendo um genoma de rAAV). Portanto, alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade adicional da presente invenção, a composição de rAAV da invenção compreende adicionalmente um capsídeo vazio numa razão entre capsídeo vazio e vírion de rAAV de pelo menos 1:1, com mais preferência, pelo menos 5:1, com ainda mais preferência, pelo menos 10:1. A composição de rAAV pode compreender o vírion de rAAV, conforme definido acima, e um capsídeo vazio, tal como, por exemplo definido no documento WO 2016/055437, que é incorporado no presente documento a título de referência e, conforme descrito, em Aalbers et al. (2017) Hum. Gene Ther. 28(2):168-178. O capsídeo vazio pode ser do mesmo serotipo ou de um diferente serotipo em comparação ao vetor rAAV-transgene da composição da invenção. De preferência, o capsídeo vazio é do mesmo serotipo que o vírion de rAAV. Dentro de tal composição de rAAV, o capsídeo vazio e o capsídeo do vírion de rAAV pode compreender uma proteína de capsídeo modificada da invenção, de preferência, o mesmo tipo de proteínas de capsídeo modificado. No entanto, também é abrangida uma composição de rAAV em que os capsídeos vazios têm um serotipo diferente ou são proteínas de capsídeo diferentemente modificado em comparação às proteínas de capsídeo modificado do vírion de rAAV. Além disto, é abrangida uma composição de rAAV em que os capsídeos vazios têm uma mistura de serotipos, tal como, porém sem limitação, uma mistura de capsídeos AAV2 e AAV5. Os inventores relatam um efeito crescente de expressão transgênica nas articulações após a administração intra-articular de vírions de rAAV misturados por adição com uma quantidade significativa de capsídeos vazios. De preferência, no vírion de rAAV e no capsídeo vazio estão presentes na composição numa razão entre capsídeo vazio e vírion de rAAV de pelo menos 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1, 15:1, 20:1, 50:1, 100:1 ou 1.000:1, de preferência, pelo menos 5:1 (*isto é*, uma quantidade de capsídeos vazios que é pelo menos 5 vezes a quantidade de vetores rAAV-transgene). De preferência, a dita composição compreende vírion de rAAV e capsídeo vazio numa razão entre capsídeo vazio e vetor rAAV-transgene de, no máximo, 10.000:1, 5000:1, 4.000:1, 3.000:1, 2000:1, 1.000:1, 500:1, 400:1, 300:1,

200:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1 ou 5:1, de preferência, no máximo 1000:1, de preferência, a dita composição compreende vírion de rAAV e capsídeos vazios numa razão entre capsídeo vazio e vírion de rAAV entre 1:1 a 100:1, 2:1 a 100:1, 5:1 a 100:1, 1:1 a 20:1, 2:1 a 20:1 ou, de preferência, entre 5:1 a 20:1.

[076] No presente documento é fornecida uma modalidade em que o vírion de rAAV e os capsídeos vazios estão presentes numa única composição. Além disto, é abrangida na presente invenção uma modalidade alternativa em que o vírion de rAAV e os capsídeos vazios estão presentes (pelo menos, duas ou mais) composições separadas distintas. Nesta modalidade alternativa, o vírion de rAAV e os capsídeos vazios podem ser administrados separadamente no tempo (*por exemplo*, sequencialmente) e/ou localização, em que a localização deve ser entendida como o sítio de administração. Além disto, o vírion de rAAV e os capsídeos vazios podem ser administrados simultaneamente, *por exemplo*, substancialmente no mesmo tempo, opcionalmente numa localização separada.

[077] Num terceiro aspecto, a presente invenção se refere a uma composição de rAAV e a um imunossupressor para uso no tratamento ou na prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou na prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica, em que a composição de rAAV é conforme definido acima e em que o tratamento ou prevenção compreende a administração da composição de rAAV e a administração do imunossupressor a um indivíduo. O documento nº WO 2016/055437, incorporado no presente documento a título de referência, divulga um efeito crescente de um imunossupressor na expressão transgênica de AAV quando os indivíduos são tratados tanto com imunossupressores quanto vírions de rAAV. Além disto, o documento nº WO 2016/055437 divulga um efeito sinérgico surpreendente do imunossupressor junto dos vetores vazios na expressão transgênica de rAAV. Numa modalidade, o imunossupressor é aplicado separadamente da composição de rAAV, em que separado significa separação na localização e/ou no tempo. Em tal modalidade, o imunossupressor e a composição de rAAV podem estar presentes em composições separadas e distintas. O imunossupressor, o vírion de rAAV e opcionalmente os vetores vazios podem estar, cada um, presentes numa composição separada

distinta. Em outra modalidade, o imunossupressor e a composição de rAAV pode estar presente numa única composição. Numa modalidade adicional, o vírion de rAAV e o imunossupressor estão presentes numa única composição e, de preferência, esta composição é usada no tratamento junto de uma composição separada que compreende o capsídeo vazio. Numa outra modalidade adicional, o imunossupressor e o capsídeo vazio estão presentes numa única composição e, de preferência, esta composição é usada no tratamento junto de uma composição separada que compreende o vírion de rAAV. Portanto, a invenção também fornece uma composição que compreende um capsídeo vazio e um imunossupressor, conforme definido no presente documento, para uma composição que compreende um vírion de rAAV e um imunossupressor, conforme definido no presente documento, e para uma composição que compreende uma composição de rAAV e um imunossupressor, conforme definido no presente documento.

[078] De preferência, um imunossupressor para uso na presente invenção é um inibidor de célula imune inata, de preferência, um inibidor de macrófago. Uma célula imune inata é definida no presente documento como um neutrófilo, macrófago, monócito, eosinófilo, basófilo ou célula dendrítica, que tem o potencial para participar da resposta inflamatória a uma substância estranha. Um inibidor de célula imune inata é definido no presente documento como um agente que resulta numa diminuição na atividade de célula imune inata e/ou número de célula imune inata. Um inibidor de macrófago é definido no presente documento como um agente que resulta numa diminuição na atividade de macrófago e/ou número de macrófago. Um “macrófago” é tendido no presente documento como uma célula imune inata que engole e difere dejetos celulares, substâncias estranhas, micróbios e células cancerosas num processo denominado de fagocitose. De preferência, a célula imune inata ou inibidor de macrófago da invenção’ resulta numa diminuição de pelo menos 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95% ou, de preferência, de 100% do número ou atividade de células ou macrófagos imunes inatos em comparação ao número ou atividade inicial de células ou macrófagos imunes inatos antes do tratamento. A atividade e/ou número de células ou macrófagos imunes inatos podem ser detectados por qualquer ensaio adequado conhecido pela pessoa versada na técnica, tal como, porém sem limitação, MTT

(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazólio) ensaio colorimétrico para testar atividade citotóxica do macrófago *in vitro*, conforme descrito por Ferrari et al. (Journal of Immunological Methods, 131 (1990) 165-172), por meio da medição de níveis de citocina (*por exemplo*, CCL2, TNF), por meio de métodos histológicos e histoquímicos, por exemplo, por identificação de CD68 ou por detecção por imageamento por ressonância magnética (MRI) *in vivo* da absorção de óxido de ferro superparamagnético (SPIO) pelos macrófagos, de preferência, após administração intravenosa de SPIO, conforme revisado por Yi-Xiang J. Wang (Quant. Imaging Med Surg (2011)1:35-40). A detecção por ser ou *in vitro* ou *in vivo*. De preferência, a detecção *in vivo* está num modelo animal, de preferência, um modelo de rato ou de murganho.

[079] De preferência, o imunossupressor é um glicocorticoide e/ou a bisfosfonato, de preferência, um bisfosfonato lipossomal. Os exemplos particulares não limitativos de glicocorticoides são cortisol, cortisona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, beclometasona, acetato de fludrocortisona, acetato de deoxicorticosterona acetato e aldosteron. De preferência, o imunossupressor é triamcinolona. Os exemplos particulares não limitativo de bisfosfonatos são etidronato, clodronate, tiludronato, pamidronato, neridronato, olpadronato, alendronato, ibandronato, risedronato e zoledronato. De preferência, o bisfosfofanato é um bisfosfofanato encapsulado no lipossoma, ou bisfosfofanato lipossomal, de preferência clodronato lipossomal. De preferência, o glicocorticoide não é dexametasona. Deve-se entender que o inibidor de inflamação ou de macrófago da invenção não se limita a glicocorticoides e/ou a bisfosfonato. Por exemplo, o inibidor de inflamação ou de macrófago da invenção também podem ser um anticorpo inflamatório ou de depleção de macrófago, tal como um anticorpo anti-F4/80. De preferência, tal anticorpo é um anticorpo humano ou humanizado. Imunossupressores relevantes adicionais a serem usados na presente invenção são fármacos citostáticos (*por exemplo*, agentes alquilantes e/ou antimetabólitos, tais como metotrexato), fármacos que modificam a via de sinalização purinérgica (*por exemplo*, metotrexato, análogos de adenosina, antagonistas ou agonistas de receptor de adenosina), fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDS, *por exemplo*, ibuprofeno, diclofenaco, meloxicam,

naproxen, ácido acetilsalicílico), produtos biológicos, tais como bloqueadores de TNF (*por exemplo*, infliximab, etanercept, adalimumab, certolizumab, golimumab), bloqueadores de IL-6 (*por exemplo*, tocilizumab), bloqueadores de IL-2 (*por exemplo*, basiliximab, daclizumab), bloqueadores de IL-1 β (*por exemplo*, anakinra, rilonacept, canakinumab) IL-17 (secuquinumab, brodalumab, ixequinumab), anti-IL-12/IL-23 (ustequinumab), um inibidor de PDE4 (apremilasto) muromonab, abatacept e/ou rituximab e/ou outros compostos, tais como hidroxicloroquina, cloroquina, leflunomida, sulfasalazina, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, sal de ouro, inibidores de mTOR (*por exemplo*, rapamicina/sirolimus, everolimus) e penicillamina.

[080] De preferência, a composição de rAAV e/ou composição que compreende capsídeos vazios e/ou a composição que compreende o imunossupressor compreende adicionalmente um carreador farmacologicamente aceitável, diluentes, solubilizante, carga, conservante e/ou excipiente, conforme definido ao longo do presente documento.

[081] De preferência, a terapia gênica de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente a administração de um imunossupressor, conforme definido no presente documento, ou presente dentro da composição de rAAV ou compreendido numa composição separada distinta, *isto é*, separada e distinta da composição de rAAV. Na administração, a composição de rAAV e/ou capsídeos vazios e/ou imunossupressor da invenção é entregue a um indivíduo, uma célula, tecido ou órgãos do dito indivíduo, de preferência, um indivíduo que sofre de uma condição ou doença, conforme definido no presente documento. De preferência, a composição de rAAV e o imunossupressor são administrados simultaneamente. A administração simultânea deve ser entendida no presente documento como a administração mais ou menos ao mesmo tempo, de preferência, com intervalos de, no máximo, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 12 horas ou 24 horas, de preferência, intervalos de, no máximo, 15 minutos. Em outra modalidade, a composição de rAAV e o imunossupressor são administrados sequencialmente, em que, de preferência, o imunossupressor é administrado antes da composição de rAAV. De preferência, o imunossupressor é administrado pelo menos 1 hora, 3 horas, 12 horas, 24 horas, 2 dias, 4 dias ou 1 semana antes da administração da

composição de rAAV. Caso os vírions de rAAV e os capsídeos vazios estejam presentes em composições separadas, o imunossupressor pode ser administrado simultaneamente ou dentro de pelo menos 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 1 dia, 2 dias ou 1 semana antes dos capsídeos vazios e os capsídeos vazios são administrados, por sua vez, simultaneamente ou dentro de pelo menos 15 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 1 dia, 2 dias ou 3 dias antes do vírion de rAAV.

[082] Nas modalidades definidas no presente documento, o imunossupressor pode ser administrado repetidamente, *isto é*, anterior e/ou simultaneamente à composição de rAAV. Conforme indicado no presente documento acima, de preferência, a composição de rAAV compreende uma quantidade significativa de capsídeos vazios. Além disto, a invenção abrange a administração tanto de vetores rAAV-transgene quanto capsídeos vazios em composições separadas distintas que podem ser administradas simultânea ou sequencialmente num método ou uso da invenção. Caso compreendido em composições separadas, os vetores rAAV-transgene e capsídeos vazios são administrados, de preferência, simultaneamente. Numa modalidade adicional, os capsídeos vazios são administrados, no máximo, 3 dias, 2 dias, 1 dia, 24 horas, 12 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos, 15 minutos ou 5 minutos, de preferência, no máximo 24 horas, antes da administração do vetor rAAV-transgene. Além disto, caso compreendido em composições separadas, os vetores rAAV-transgene e capsídeos vazios são administrados, de preferência, no mesmo sítio.

[083] A dose de imunossupressor depende do tipo de imunossupressor. As dosagens eficazes são conhecidas pela pessoa versada na técnica. Uma dosagem terapêutica preferencial de triamcinolona é indicada acima. Uma dosagem eficaz terapêutica preferencial de clodronato lipossomal é, de preferência, uma dose eficaz terapêutica, conforme conhecido pela pessoa versada na técnica, *por exemplo*, de preferência, 80 a 320 mg/dose intra-articular, com mais preferência, 160 mg/dose intra-articular (Barrera et al. 2000, *artrite & Rheumatism* Vol 43(9), p1951-1959).

[084] De modo geral, um distúrbio na articulação é denominado de artropatia, e quando envolve inflamação de uma ou mais articulações, o distúrbio é denominado de artrite. A maioria dos distúrbios na articulação envolvem artrite, no

entanto, danos à articulação causados por trauma físico externo, não são denominados tipicamente de artrite. O termo “doença artrítica”, conforme usado no presente documento, também denominado de “artrite”, é definido no presente documento como uma forma de distúrbio na articulação que envolve inflamação de uma ou mais articulações. Atualmente, estima-se que há mais de cem formas diferentes de artrite. A doença artrítica é entendida no presente documento como se referindo a “dor na articulação” ou “doença na articulação”. Numa modalidade preferencial, a doença artrítica é selecionada do grupo que consiste em Doença de Still de adulto, espondilite anquilosante, artrite, dor nas costas, doença de Behçet, trauma contuso, bursite, doença de deposição de pirofosfato de cálcio (CPPD), síndrome do túnel do carpo, condromalácia da patela, síndrome da fadiga crônica, síndrome da dor regional complexa, síndrome periódica associada à criopirina síndromes (CAPS), doença degenerativa do disco, displasia do desenvolvimento do quadril, Ehlers-Danlos, febre mediterrânea familiar, fibromialgia, quinta doença, arterite de células gigantes, gota, hemocromatose, artrite infecciosa, artrite inflamatória, doença inflamatória intestinal, substituição articular, artrite juvenil, dermatomiosite juvenil (JD), artrite idiopática juvenil (JIA), artrite reumatoide juvenil, esclerodermia juvenil, doença de Kawasaki, lúpus, lúpus em crianças e adolescentes, doença de Lyme, doença mista do tecido conjuntivo, miosite (incluindo polimiosite, dermatomiosite), osteoartrite (OA), osteoporose, doença de Paget, reumatismo palindrômico, síndrome da dor femoropatelar, doenças reumáticas pediátricas, SLE pediátrico, polimialgia reumática, pseudogota, artrite psoriática, fenômeno de Raynaud, artrite reativa, simpático-reflexa, síndrome de Reiter, febre reumática, reumatismo, artrite reumatoide, esclerodermia, artrite séptica, doença de Sjögren, estenose espinhal, espondiloartrite, doença de Still, artrite idiopática juvenil sistêmica, lúpus eritematoso sistêmico, lúpus eritematoso sistêmico em crianças e adolescentes, esclerose sistêmica, arterite temporal, tendinite, vasculite e granulomatose de Wegener. Numa modalidade preferencial adicional, a doença artrítica é selecionada a partir do grupo que consiste em artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide juvenil, osteoartrite (OA), gota, pseudogota, espondiloartrite (SpA), artrite psoriática, espondilite anquilosante, artrite séptica, artrite, artrite idiopática juvenil, trauma contuso, substituição de articulação e

doença de Still. Numa modalidade mais preferencial, a doença artrítica é um distúrbio na articulação que envolve inflamação de uma ou mais articulações. De preferência, a doença artrítica é selecionada do grupo que consiste em artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide juvenil, osteoartrite (OA), gota, pseudogota, espondilartrite (SpA), artrite psoriática, espondilite anquilosante, artrite séptica, artrite, artrite idiopática juvenil e doença de Still.

[085] Alternativamente, ou em combinação com outra modalidade, numa modalidade preferencial adicional da presente invenção, o vírion de rAAV ou a composição de rAAV é administrada de maneira sistêmica e/ou local. Uma composição de rAAV e/ou capsídeos vazios e/ou um imunossupressor da invenção podem ser administrados direta ou indiretamente com o uso de meios adequados conhecidos na técnica. Métodos e usos da invenção incluem entrega e administração da composição de rAAV e/ou vetor vazio e/ou imunossupressor sistemicamente, regionalmente ou localmente ou por qualquer rota, por exemplo, por injeção, infusão, por via oral (*por exemplo*, ingestão ou inalação) ou por via tópica (*por exemplo*, por via transdérmica). A administração e rotas de entrega exemplificativas incluem as vias intravenosa (i.v.), intra-articular, intraperitoneal (i.p.), intra-arterial, intramuscular, parenteral, subcutâneo, intrapleural, tópica, dérmica, intradérmica, transdérmica, parenteral, *por exemplo*, transmucosal, intracraniana, intraespinhal, oral (alimentar), pela mucosa, respiração, intranasal, intubação, intrapulmonar, instilação intrapulmonar, bucal, sublingual, intravascular, intratecal, intracavidade, iontoforética, intraocular, oftálmica, ótica, intraglandular, intraórgão, intralinfática. Os aprimoramentos para fornecer a um indivíduo ou a célula, tecido, órgão do dito individual uma composição de rAAV e/ou capsídeos vazios e/ou um imunossupressor da invenção, são antecipados considerando o progresso que já foi alcançado até então. Tais aprimoramentos futuros podem evidentemente ser incorporados para alcançar o efeito mencionado da invenção. Durante a administração de uma composição de rAAV e/ou capsídeos vazios e/ou um imunossupressor da invenção, é preferencial que tal combinação e/ou composição seja dissolvida numa solução que seja compatível com o método de entrega. Para administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, intratecal, intra-articular e/ou intraventricular, é preferencial que a solução seja uma solução

salina fisiológica. Caso um imunossupressor esteja presente dentro da composição de rAAV da invenção, o imunossupressor é administrado no mesmo sítio que a composição de rAAV, isto é, de preferência, localmente, conforme indicado acima. Na modalidade em que o imunossupressor está compreendido dentro de uma composição separada distinta da composição de rAAV, o imunossupressor pode ser administrado sistemicamente, de preferência, por via intramuscular ou intravenosa. A composição de rAAV também pode ser administrada localmente, de preferência, em sítio do corpo que compreende números substantivos de macrófagos, conforme definido no presente documento, e o imunossupressor é administrado sistemicamente, de preferência, por via intramuscular ou intravenosa. A invenção também abrange uma modalidade em que o imunossupressor e a composição de rAAV, embora presentes em composições distintas, são administrados no mesmo sítio, de preferência, localmente, com mais preferência, por via intratecal. Conforme indicado adicionalmente no presente documento, a administração de tais composições distintas ocorrer simultânea ou sequencialmente. Numa modalidade preferencial da presente invenção, pelo menos uma dentre a composição de rAAV e o imunossupressor é administrado localmente. Com mais preferência, a administração local é uma administração intra-articular. “Injeção intra-auricular” (também conhecida como “injeção na articulação” ou “injeção intra-auricular”) é definida no presente documento como injeção ou infusão na articulação. A injeção intra-auricular é usada tipicamente para administração de um agente anti-inflamatório numa articulação afetada por inflamação.

[086] Num aspecto adicional, a presente invenção se refere a uma composição de rAAV que compreende um vírion de rAAV da invenção e um carreador, diluente, solubilizante, carga, conservante e/ou excipiente farmacologicamente aceitáveis, de preferência um carreador farmacologicamente aceitável conforme definido no presente documento. Numa modalidade preferencial, a composição compreende adicionalmente capsídeos vazios conforme definido no presente documento e/ou um imunossupressor conforme definido no presente documento

[087] Num aspecto adicional, a presente invenção se refere a um método

para tratar, impedir ou suprimir sintomas associados a uma doença artrítica, em que o método compreende a etapa de administração intra-articular de um medicamento que compreende uma quantidade eficaz de um vírion de rAAV, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 ou de uma composição de rAAV conforme definido acima.

[088] Uma “quantidade terapeuticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessários para obter o resultado terapêutico. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ácido nucleico, construto ácido nucleico, o vírion de rAAV ou a composição farmacêutica podem variar, de acordo com fatores, tais como o estado da doença, idade, sexo e peso do indivíduo a ser tratado, e a capacidade do ácido nucleico, construto do ácido nucleico, vírion de rAAV ou composição farmacêutica para provocar uma resposta desejada no indivíduo. Os regimes de dosagens podem ser ajustados para fornecer a resposta terapêutica ideal. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é tipicamente uma na qual quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do ácido nucleico, construto de ácido nucleico, vírion de rAAV ou composição farmacêutica são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma “quantidade profilaticamente eficaz” se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e durante períodos de tempo necessário para obter o resultado profilático desejado, tais como prevenir ou inibir várias afecções. Uma dose profilática pode ser usada em indivíduos antes num estágio anterior da doença, e uma quantidade eficaz profilaticamente pode ser maior ou menor que uma quantidade terapeuticamente eficaz em alguns casos. A dosagem a ser administrada pode depender consideravelmente da afecção e do tamanho do indivíduo que é tratado assim como a formulação terapêutica, frequência de tratamento e a rota de administração. Os regimes para continuar a terapia, incluindo dose, formulação e frequência podem ser guiados por resposta inicial e julgamento clínico.

[089] O termo “indivíduo” ou “paciente” é usado de maneira intercambiável no presente documento e se refere a um animal, incluindo a espécie humana, que é tratável com as composições e/ou rAAV da presente invenção. Conseqüentemente, o termo “indivíduo” ou “paciente” inclui, porém sem limitação, um ser humano, um primata não humano, tais como chimpanzés e outros primatas

e espécie de macaco ou qualquer mamífero, tal como cachorro, gato, cavalo, ovelha, porco, vaca etc. Numa modalidade preferencial da presente invenção, o indivíduo tratado com um rAAV, de acordo com a presente invenção, é um mamífero, com mais preferência, um ser humano, cachorro, gato ou cavalo com máxima preferência, um ser humano.

[090] No presente documento e nas reivindicações, o verbo “compreende” e suas conjugações são usados em sentido não limitativo e significam que os itens após a palavra estão incluídos, porém os itens não mencionados especificamente não são excluídos. Além disto, a referência a um elemento pelo artigo indefinido “um” ou “uma” não exclui a possibilidade de mais de um elemento estar presente, salvo quando o contexto indicar claramente há um e apenas um dos elementos. Dito isto, o artigo indefinido “um” ou “uma” significa normalmente “pelo menos um(a)”.

[091] A palavra “aproximadamente” ou “cerca de” quando usada associada a um valor numérico (aproximadamente 10, cerca de 10) significa, de preferência, que o valor pode ser o dado valor de 10, mais ou menos 10% do valor.

[092] Todas as referências à patente e à literatura citadas no presente relatório descritivo são incorporadas no presente documento a título de referência em sua totalidade.

[093] Os exemplos a seguir são oferecidos apenas a título de ilustração, e não devem limitar o escopo da presente invenção de qualquer maneira.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[094] A presente invenção será discutida mais detalhadamente a seguir, com referência aos desenhos anexos:

[095] A Figura 1: Triagem de serotipos de capsídeo nas células HEK293T e FLS. O lisado cru que contém 7 serotipos de capsídeo mutante (mais AAV5) que expressa proteína fluorescente amarela (YFP) foram usados para submeter as células HEK293T à transdução ou 3 diferentes linhagens celulares de FLS (cada uma de um paciente de RA diferente). Após 72 horas (HEK293T) ou 6 dias (FLS), as células foram ensaiadas quanto à porcentagem de células que expressam YFP por citometria de fluxo. O painel A mostra % de células HEK 293T que expressam YFP; o Painel B mostra a % de células que expressam YFP em 3 diferentes

linhagens celulares de FLS; O Painel C mostra a intensidade fluorescência média (MFI) em células HEK293T; Painel D mostra o MFI em 3 diferentes linhagens celulares de FLS (todas células); o Painel E mostra MFI em 3 diferentes linhagens celulares de FLS (apenas população positiva). A legenda da amostra é retratada na Tabela 2.

[096] A Figura 2: Os mutantes de capsídeo mostram expressão de luciferase aumentada vs. wt-AAV5 em células FLS. AAV purificado (4 serotipos mutantes ou AAV5) que expressam proteína de fusão YFP-Luc foram usados para submeter à transdução três diferentes linhagens celulares de FLS de pacientes diferentes com RA: BB5498 (FLS 1), BB5540 (FLS 2) e BB7144 (FLS 3) com o uso de duas MOIs (20.000 ou 10.0000 rAAV partículas por célula). Após 4 dias, as células foram lisadas e a expressão de luciferase foi medida. Os dados são apresentados como níveis absolutos de expressão de luciferase (RLU; barras brancas) ou aumento em vez em relação a AAV5 (barras pretas). O Painel A mostra FLS 1 em MOI 20K; Painel B mostra FLS 1 a uma MOI de 100K; Painel C mostra FLS 2 a uma MOI de 20K; Painel D mostra FLS 2 a uma MOI de 100K; Painel E mostra FLS 3 a uma MOI de 20K; e Painel F mostra FLS 3 a uma MOI de 100K. As barras abertas mostram luciferase (RLU) e as barras preenchidas mostram “o aumento em vez” em relação ao AAV5. Num experimento diferente, três linhagens celulares adicionais de FLS de pacientes com RA foram submetidas à transdução com AAV (7 serotipos mutantes ou AAV5) que expressam luciferase: BB4308 (FLS 4), BX 1592 (FLS 5), BB4426 (FLS 6) com de duas 2 MOIs (10K ou 100K partículas por célula de rAAV). O Painel G mostra FLS 4 a uma MOI de 10K; Painel H mostra FLS 4 a uma MOI de 100K; Painel I mostra FLS 5 a uma MOI de 10K; Painel J mostra FLS 5 a uma MOI de 100K; o Painel K mostra FLS 6 a uma MOI de 10K; e o Painel L mostra FLS 3 a uma MOI de 100K.

[097] A eficácia de transdução dos 7 serotipos mutantes ou AAV5 (MOI de 100K) também foi avaliada nas células HEK293T (Painel M). As barras abertas mostram a expressão de luciferase (RLU) e as barras preenchidas mostram “o aumento em vez” em relação ao AAV5.

[098] Figura 3A: Os mutantes de capsídeo exibem expressão gênica aumentada *in vivo*. Dois mutantes de capsídeo (AAV9-A2 e AAV7-A6) foram

comparados a wtAAV5 com o uso do modelo sinovial de bolsa de ar. O vetor que expressa luciferase foi administrado no dia 0 após a formação da bolsa de ar, e a expressão de luciferase foi medida por imageamento de animal vivo (IVIS) no dia 3 após a transdução. Os dados mostrados são a luminescência (fóton/segundo/centímetro quadrado m²/esterradiano) na bolsa de ar em média+SEM.

[099] A Figura 3B: Num segundo experimento, 5 mutantes de capsídeo selecionados (AAV1-P4, AAV7-A6, AAV9-A2, AAVrh10-A2, AAVrh10-A6) e wtAAV5 foram injetados nas articulações dos joelhos dos camundongos. Uma luciferase que expressa o vetor foi injetada no dia 0, e a expressão foi medida por imageamento vivo (IVIS) nos instantes indicados após a administração. Os dados mostrados são a luminescência (fóton/segundo/centímetro quadrado m²/esterradiano)(painel esquerdo) na média+SEM. **P<0,05, ***P<0,01, ****P<0,00001 vs. wtAAV5 no dia 14. Figura 3C: Aumento em vez vs. wtAAV5.

[0100] Figura 4: alinhamento em formato CLUSTAL por MAFFT FFT-NS-I (v7.215). Abaixo do alinhamento está uma chave que denota um resíduo conservado (*); e uma mutação não conservativa ().

[0101] Figura 5: alinhamento de sequência múltipla CLUSTAL por MUSCLE (3.8). Abaixo do alinhamento há uma chave que denota um resíduo conservado (*); uma mutação conservativa (:); uma mutação semiconservativa (.); e uma mutação não conservativa ().

[0102] Figura 6: Alinhamento em formato CLUSTAL de insertos P4, A2, A6, P2 e QR-P2 (SEQ ID NOs: 8 – 12) por MAFFT FFT-NS-I (v7.215). Abaixo do alinhamento está uma chave que denota um resíduo conservado (*); e uma mutação não conservativa ().

[0103] Figura 7: alinhamento de sequência múltipla CLUSTAL dos insertos P4, A2, A6, P2 e QR-P2 (SEQ ID NOs: 8-12) por MUSCLE (3.8). Abaixo do alinhamento está uma chave que denota um resíduo conservado (*); e uma mutação não conservativa ().

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0104] A tabela 1 fornece uma explicação das referências de sequência em correlação com as SEQ ID NOs.

TABELA 1: EXPLICAÇÃO DAS REFERÊNCIAS DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO:	serotipo	Capsídeo modificado/inserto/tipo selvagem
1	AAV1	Capsídeo modificado
2	AAV2	Capsídeo modificado
3	AAV7	Capsídeo modificado
4	AAV9	Capsídeo modificado
5	AAVrh10	Capsídeo modificado
6	AAVrh10	Capsídeo modificado
7	AAV DJ-QR	Capsídeo modificado
8	Inserto A2	Inserto
9	Inserto A6	Inserto
10	Inserto P2	Inserto
11	Inserto P4	Inserto
12	Inserto QR-P2	Inserto
13	AAV1	Capsídeo do tipo selvagem
14	AAV2	Capsídeo do tipo selvagem
15	AAV7	Capsídeo do tipo selvagem
16	AAV9	Capsídeo do tipo selvagem
17	AAVrh10	Capsídeo do tipo selvagem
18	AAV DJ-QR	Capsídeo sintético
19	AAV5	Capsídeo do tipo selvagem

EXEMPLOS**EXEMPLO 1****TRIAGEM INICIAL DA BIBLIOTECA DE CAPSÍDEOS****1.1. MATERIAIS E MÉTODOS**

[0105] Placas com 96 poços marcadas (e subsequentemente secas) com lisado cru que contém AAV de 91 serotipos de capsídeo de AAV diferentes foram obtidas da Dirk Grimm e Kathleen Börner na Universidade de Heidelberg. Cada vetor codificou um transgene YFP acionado por um promotor CMV. À medida que os FLS são as células-alvo primárias na articulação, uma biblioteca de capsídeos de AAV mutantes foi triada para serotipos que mostram expressão aumentada nos

FLS humanos isolados das juntas de pacientes com artrite reumatoide (RA-FLS) (conforme descrito em van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427). RA-FLS foram colocados em placa (2.500/poço, 37 °C/5% de CO₂) diretamente nas placas marcadas (DMEM-GlutaMAX-I (Gibco, referência 31966-021), 10% de FBS (Soro Bovino Gold inativado por calor (HI), Gibco, referência A15-151), HEPES a 10 mM (Gibco, referência 15630-056), gentamicina a 50 µg/ml (Gibco, referência 15710-049), penicilina a 100 U/ml/estreptomicina a 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, referência P0781), e todos os poços foram visualizados para expressão de YFP por fluorescência após 6 dias.

1.2. RESULTADOS

[0106] Transdução de eficácia de mutantes de capsídeo vs. WT-AAV5 em FLS de pacientes com RA.

[0107] Na triagem dos 91 mutantes de capsídeo, embora os níveis de expressão geral estivessem baixos, os presentes inventores identificaram 7 serotipos diferentes que mostraram expressão superior a wtAAV5: AAV9-A2, AAV7-A6, AAV1-P4, AAVDJ-QR-P2, AAVrh10-A6, AAVrh10-A2 e AAV2-P2 (sequências de aminoácidos SEQ ID NO: 1 – 7; wtAAV5 SEQ ID NO: 19).

[0108] Os lisados crus de todos os 7 vetores foram usados num ensaio de transdução *in vitro* em 3 diferentes linhagens celulares de FLS do paciente e em células HEK293T (exemplo 2).

TABELA 2: LEGENDA DA AMOSTRA PARA A FIGURA 1

Amostra	Serotipo de capsídeo	Inserto/sequência modificada	Inserto	Posição em VP1	SEQ ID NO:
5	5	nenhum	nenhum	-	19
61	AAV1	GQSGNDVRSANAQAA	P4	588 – 602	1
33	AAV9	GQRGNYSRGVDAQAA	A2	586 – 600	4
34	AAVrh10	GQRGNYSRGVDAQAA	A2	588 – 602	6
50	AAV2	QGQSGCDCRGDCFCA (QAA)	P2	585 – 599	2
88	AAV-DJ-QR	QGQRGCDCRGDCFCA (QAA)	QR-P2	587 – 601	7
43	AAV7	GQRGNEARVREAQAA	A6	587 – 601	3
46	AAVrh10	GQRGNEARVREAQAA	A6	588 – 602	5

EXEMPLO 2

EXPRESSÃO DOS LISADOS CRUS DE 7 MUTANTES SELECIONADOS

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

PRODUÇÃO DE AAV

[0109] Detalhes sobre a produção dos lisados crus de AAV podem ser encontrados em Grosse et al. (J. Virol, 2017, doi: 10.1128/JVI.01198-17).

[0110] As alíquotas de lisado cru para cada um dentre os 7 mutantes de capsídeo selecionados (mais wtAAV5 como um controle) foram usadas para submeter as células à transdução (HEK293T ou 3 diferentes linhagens celulares de FLS isoladas dos pacientes com RA), e a expressão de YFP foi medida por citometria de fluxo 3 (HEK293T) -5 dias (FLS) após a transdução. Detalhadamente, a HEK293T foi semeada numa placa com 96 poços (Greiner Bio-One, referência 655180) a 45.000 células por poço. Os RA-FLS foram semeados numa placa com 96 poços a 2.500 células por poço. Após a incubação de um dia para o outro, os sobrenadantes celulares foram substituídos por DMEM-glutaMAX-I a 40 µl (Gibco 31966-021) que contém 0,001% de solução plurônica F68 (Sigma P5556). Os lisados de vírus foram adicionados *in duplo*, 10 µl por poço. Após 4 horas, a doxorubicina (concentração final 0,4 µM) (Sigma D1515) em FBS que contém DMEM-glutaMAX-I (Soro Bovino Gold inativado por calor (HI), Gibco, referência A15-151), concentração final a 1%, foi adicionada aos poços (50 µl por poço). No dia seguinte, o meio de FLS foi removido, e DMEM-glutaMAX-I (10% de FBS (Soro Bovino Gold inativado por calor (HI), Gibco, referência A15-151), HEPES a 10 mM (Gibco, referência 15630), gentamicina a 50 µg/ml (Gibco referência 15710-049), penicilina a 100 U/ml/estreptomicina a 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, referência P0781)) foi adicionado (200 µl por poço). O meio de células HEK293T não foi mudado. Três (células HEK293T) ou 6 dias (FLS) após a transdução, as células foram submetidas à tripsinização com o uso de 0,5% de Tripsina/EDTA (Gibco referência 15400-054) em PBS (Gibco, referência 10010) e analisadas quanto à expressão de YFP por citometria de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences). Tanto a porcentagem de células de expressão quanto a intensidade de fluorescência média (MFI) para todas as células foram determinadas.

2.2. RESULTADOS

[0111] Os lisados crus de todos os 7 vetores foram usados num ensaio de transdução *in vitro* em 3 diferentes linhagens celulares de FLS do paciente e em células HEK293T. As células foram testadas quanto à percentagem de células que expressam YFP por microscopia de fluorescência (dados não mostrados) ou citometria de fluxo (Figura 1 painéis A – E). Embora houvesse alguma variabilidade entre os tipos de célula, todos os capsídeos mutantes forneceram expressão tanto em células FLS quanto HEK293T superior a AAV5-WT (Figura 1). A Tabela 2 fornece a legenda da amostra para a Figura 1. Com base nestes resultados, quatro mutantes de capsídeo foram selecionados para investigação adicional (consultar o exemplo 3).

EXEMPLO 3

TESTE IN VITRO DE VARIANTES DE CAPSÍDEO EM HEK293T E FLS

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

[0112] 3.1.1 Quatro das proteínas de capsídeo mutante, AAV9-A2, AAV7-A6, AAV1-P4 e AAVDJ-QR-P2, foram investigadas adicionalmente. O vetor purificado (gradiente de iodixanol) que expressa uma proteína de fusão YFP-Luciferase (a fim de permitir a visualização (YFP), assim como quantificação por ensaio de luciferase) foi gerado. Três diferentes linhagens de FLS isolados de pacientes com artrite reumatoide (conforme descrito em van de Sande MG et al., (2011) Ann Rheum Dis 70: 423-427) foram submetidas à transdução com cada serotipo a 2 doses de vetor (MOI 20.000 ou 100.000) e após 4 dias, as células foram colhidas, e a expressão gênica foi quantificada por ensaio de luciferase (Kit de Ensaio de Luciferase Promega).

[0113] Detalhadamente, os RA-FLS foram colocados em placa a 2.500 células/poço numa placa com 96 poços (Greiner Bio-One, referência 655207) no meio (DMEM-GlutaMAX (Gibco referência 31966-021), 10% de FBS (Soro Bovino Gold inativado por calor (HI), referência A15-151), HEPES a 10 mM (Gibco referência 15630-056), gentamicina a 50 µg/ml (Gibco, referência 15710-049), penicilina a 100 u/ml/estreptomicina a 100 µg/ml (Sigma-Aldrich Merck referência P0781 Após 48 horas, o meio foi removido, e o vírus (in DMEM-Glutamax que contém 0,001% de Pluronic-68 (Sigma, referência p5556)) foi adicionado num MOI

de 20.000 ou 100.000. Após 4 horas, o meio que contém Doxorubicina (Sigma, referência D1515, concentração final 0,4 μM) e FBS (concentração final 1%) foi adicionado.

[0114] 24 horas depois, o meio foi substituído por DMEM-GlutaMAX, (10% de FBS, HEPES a 10 mM, gentamicina a 50 $\mu\text{g/ml}$, penicilina a 100 u/ml, estreptomicina a 100 $\mu\text{g/ml}$). Quatro dias após a transdução, as células foram lavadas 1x com PBS a 100 μl (Gibco, referência 10010), e a atividade de luciferase foi determinada com o uso do sistema de ensaio de luciferase ONE Glo™ (Promega, referência E6110): o tampão de lise a 100 μl foi adicionado, e as células foram colocadas num agitador para 10', 900 rpm à temperatura ambiente. Subsequentemente, o lisado a 20 μl foi transferido a um substrato de placa branca com 96 poços a 80 μl (foi adicionado à 3' (escura), e a atividade de luciferase foi determinada num medido de luminosidade (1 s/poço, sinergia HT, Biotek).

[0115] 3.1.2. Num experimento semelhante, três linhagens celulares de FLS adicionais isoladas dos pacientes com artrite reumatoide foram submetidas à transdução com AAV5 e 7 mutantes de capsídeo de uma preparação de AAV diferente da descrita em 3.1.1 (AAV9-A2, AAV1-P4, AAV7-A6, AAVDJ-QR-P2, AAVrh10-A6, AAVrh10-A2, AAV2-P2) que contém um gene luciferase (MOI 10,000 e 100,000). O número de partículas vazias foi diferente entre as preparações de AAV. A fim de excluir um possível efeito na eficácia de transdução, a correção de capsídeo vazio foi feita adicionando-se partículas vazias AAV5 para igualar a porcentagem das partículas vazias por preparação.

[0116] 3.1.3. Os 7 mutantes de capsídeo da mesma preparação, conforme descrito em 3.1.2 também foram testados em células HEK293T. Detalhadamente, a HEK293T foi semeada numa placa com 96 poços (Greiner Bio-One, referência 655180) a 50000 células por poço. Após a incubação de um dia para o outro, os sobrenadantes celulares foram substituídos por DMEM-glutaMAX-I a (Gibco 31966-021) que contém 0,001% de solução plurônica F68 (Sigma P5556). Os vetores diferentes foram adicionados *in duplo*, numa MOI de 100.000. Neste protocolo, a correção de capsídeo vazio foi feita, conforme descrito para 3.1.2. Após 4 horas, a doxorubicina (concentração final 0,4 μM) (Sigma D1515) em FBS que contém DMEM-glutaMAX-I (Soro Bovino Gold inativado por calor (HI), Gibco, referência

A15-151), concentração final a 1%, foi adicionada aos poços. Três dias após a transdução, as células foram colhidas, e a expressão gênica foi quantificada por ensaio de luciferase (kit de ensaio de luciferase Promega) num medidor de luminosidade (BMG Labtech Fluostar Omega).

3.2. RESULTADOS

[0117]3.2.1 Transduções *In vitro* de três linhagens celulares de FLS diferentes foram realizadas com o uso de AAV recombinante que compreende um dentre os 4 capsídeos mutantes (assim como AAV5 como controle, produzido de maneira idêntica) seguindo o protocolo descrito em 3.1.1. Todos os 4 serotipos mostraram níveis aumentados de expressão quando comparados a AAV5, com aumentos numa faixa de 2 vezes a 35 vezes, dependendo do serotipo e da linhagem celular usada (Figura 2A-F).

[0118]3.2.2 Em outra série de experimentos, a eficácia da transdução *in vitro* de 7 capsídeos mutantes (assim como o controle de AAV5, produzido de maneira idêntica) foi avaliada em 3 linhagens celulares de FLS. Todos os 7 serotipos mostraram níveis aumentados de expressão de luciferase quando comparados a AAV5, com aumentos numa faixa de 6 vezes e 55 vezes dependendo do serotipo e da linhagem celular usada (Figura 2G-L)

[0119]3.2.3 Um experimento semelhante foi realizado em células HEK293T. A transdução com todos 7 serotipos resultou na expressão de luciferase aumentada com wtAAV5, com aumentos numa faixa de 2 vezes a 12 vezes (Figura 2M).

EXEMPLO 4

ESTUDO IN VIVO NO MODELO SINOVIAL DE BOLSA DE AR

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

[0120]Camundongos Fêmeas Balb/c (com 8 a 10 semanas de idade e ponderação 20 a 25 g; (Harlan, Boxmeer, Países Baixos)) foram alojados em gaiolas ventiladas individuais na instalação animal do Centro Médico Acadêmico, Amsterdã. Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*. Todos os experimentos animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética de Pesquisas em Animais da Universidade de Amsterdã.

MODELO SINOVIAL DE BOLSA DE AR SINÓVIO (APS)

[0121] Dois serotipos, AAV9-A2 e AAV7-A6, foram comparados contra wtAAV5. O modelo sinovial de bolsa de ar foi adaptado de Edwards et al (1981; J Pathol 134: 147-156). No dia 0, 3 ml de ar foi injetado por via subcutânea na pele dorsal de camundongos Balb/cOlaHsd fêmea com 7 a 9 semanas de idade (Harlan) (dia 0). Imediatamente após a formação da bolsa de ar, 1 ml de ar foi removido e 1 ml de AAV (2e10 genomas de vetor/camundongo em PBS (Gibco, referência 10010 que contém Pluronic F68 a 0,001% (Sigma, referência p5556) foi adicionado diretamente à bolsa de ar. Três dias após a transdução, a expressão gênica foi medida por imageamento animal *in vivo*.

IMAGEAMENTO DE EXPRESSÃO LUCIFERASE

[0122] A expressão de luciferase foi medida no dia 3. Planejou-se inicialmente continuar a monitoração da expressão durante até 3 meses após a administração do vetor, no entanto, uma infecção por parvovírus da instalação do animal resultou no término prematura de todos os experimentos em andamento. O substrato de potássio-sal de D-luciferina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, EUA) foi injetado por via intraperitoneal (150 mg/kg de peso corporal, num volume de aproximadamente 200 µl). As contagens de fóton foram obtidas 10 minutos após a administração do substrato por 5 minutos com o uso de um sistema de câmera de dispositivo de carga acoplada resfriado (CCD) (Photon Imager, Biospace Lab, Paris, France), e processamento de imagem e quantificação e análise de intensidade de sinal foram realizados com o uso de M3 Vision (Biospace Lab). O número de fótons emitido por segundo por centímetro quadro por esterradiano foi calculado como uma medida de atividade de luciferase.

CONDIÇÕES GERAIS DO ANIMAL E DECLARAÇÃO DE ÉTICA

[0123] Formação de bolsa de ar, administração de vetor e imageamento *in vivo* foram realizados sob anestesia de isoflurano (3% de isoflurano e oxigênio). No término dos experimentos, os animais foram sacrificados por perfuração cardíaca sob isoflurano anestesia, seguido por deslocamento cervical. Os estudos foram revisados e aprovados pelo comitê de uso e de cuidados com animais da Universidade de Amsterdã e realizado em total conformidade com as recomendações na Lei Holandesa sobre Bem-estar Animal (em Holandês: “Wet op Dierproeven”). Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos na

instalação animal da Universidade de Amsterdã.

4.2. RESULTADOS

[0124] Com base nestes resultados promissores, um *estudo preliminar in vivo* foi realizado com o uso do modelo sinovial de bolsa de ar (APS), em que dois serotipos, AAV9-A2 e AAV7-A6 foram comparados a wtAAV5. Devido à inoportuna infecção na instalação animal que precisou do término prematura deste estudo, foi possível obter apenas os dados de um único instante, dia 3 após a administração do vetor. Neste instante, esteve claro que os mutantes de capsídeo tiveram a expressão gênica aumentada quando em comparação a AAV5, com AAV7-A6 mostrando expressão aumentada em 6 vezes e AAV9-A2, aproximadamente 22 vezes (Figura 3A).

EXEMPLO 5:

ESTUDO IN VIVO: INJEÇÕES INTRA-ARTICULARES ANIMAIS SAUDÁVEIS

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

[0125] Camundongos machos DBA1/J (12 semanas de idade, Envigo) foram alojados em gaiolas ventiladas individuais na instalação animal do Centro Médico Acadêmico, Amsterdã. Alimento e água estavam disponíveis *ad libitum*. Todos os experimentos em animais foram realizados após a aprovação dos Experimentos em Animais de Comissão Central (CCD) e o Comitê de Ética de Pesquisa em Animais da Universidade de Amsterdã, Países Baixos.

ESTUDO DE EXPRESSÃO

[0126] Cinco rAAV que compreendem mutantes de capsídeo, isto é, AAV9-A2, AAV1-P4, AAV7-A6, AAVrh10-A6 e AAVrh10-A2, foram comparados a wtAAV5. Visto que a carga do capsídeo pode afetar a expressão (Aalbers CJ et al., Hum Gene Ther 2017;28 (2):168-178), as preparações rAAV foram corrigidas para a carga de capsídeo adicionando-se as partículas vazias de wtAAV5. Os camundongos saudáveis (n=9 por grupo) receberam injeções intra-auricular de vetor de AAV que porta o gene da luciferase em ambos os joelhos ($7,5 \times 10^9$ genomas virais por joelho). A expressão gênica foi determinada por imageamento *in vivo* em diversos instantes após a administração do vetor.

IMAGEAMENTO DE EXPRESSÃO LUCIFERASE

[0127] A expressão de luciferase foi determinada nos instantes indicados (Figura 3B). Em cada instante, o substrato de potássio-sal de D-luciferina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, EUA) foi injetado por via intraperitoneal (150 mg/kg de peso corporal, num volume de aproximadamente 200 µl). Contagens de fóton foram obtidas 15 minutos após a administração do substrato por 5 minutos com o uso de um sistema de câmera de dispositivos de carga acoplada resfriado (CCD) (Imageador de Fótons, Biospace Lab, Paris, França). O processamento de imagem e quantificação e análise de intensidade de sinal foram realizados com o uso de M3 Vision (Biospace Lab). O número de fótons emitido por segundo por centímetro quadro por esterradiano foi calculado como uma medida de atividade de luciferase.

CONDIÇÕES GERAIS DO ANIMAL E DECLARAÇÃO DE ÉTICA

[0128] A administração de vetor e imageamento *in vivo* foram realizados sob anestesia de isoflurano (4% de isoflurano e oxigênio). Os estudos foram realizados em total conformidade com as recomendações com na Lei Holandesa em Bem-estar Animal (em Holandês: "Wet op Dierproeven"). Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos na instalação animal da Universidade de Amsterdã.

5.2. RESULTADOS

[0129] No primeiro instante, o dia 3, expressão mediada por AAV no joelho é detectada em todos os grupos e aumentos no tempo (Figura 3B). Todos os mutantes de capsídeo esperam que AAV1-P4 mostre expressão aumentada vs. wtAAV5 com AAV9-A2 mostrando a expressão mais alta (aumento de aproximadamente 5 vezes vs. wtAAV5 no dia 14) (Figura 3C). Os níveis de expressão no dia 14 de alto a baixo: AAV9-A2 > AAVrh10-A2 > AAVrh10-A6 > AAV7-A6 > wtAAV5 > AAV1-P4. No dia 7, AAVrh10-A2, AAV9-A2 e AAVrh10-A6 mostram significativamente a expressão aumentada vs. wtAAV5 (**P<0,05, ***P<0,01, ****P<0.00001 vs. wtAAV5 no dia 14. (Figura 3B).

EXEMPLO 6:

DETERMINAÇÃO DE TITULAÇÕES DE ANTICORPO NEUTRALIZANTE CONTRA MUTANTES DE CAPSÍDEO EM SOROS HUMANOS

6.1 MATERIAL E MÉTODOS

[0130] As células HEK293T foram colocadas em placa em DMEM contendo

FBS a 9%, 0,9% de penicilina/estreptomicina em placas de fundo transparente com 96 poços. Permitiu-se que as células repousarem por 24 horas (a 37 °C, 5% de CO₂) antes da transdução. As amostras de soro humano (obtidas do instituto de sangue da França) foram diluídas de acordo com o seguinte: soro não diluído puro – 1:4 -1:16 – 1:64 – 1: 256 – 1:1.024 (soro significa 1 volume de vírus para 1 volume de soro). Uma amostra de plasma de camundongo agrupada (dos camundongos 10 DBA/1, obtidas 42 dias após a injeção intra-articular de um vetor AAV5) foi diluída em série em FBS, de acordo com o seguinte: 1:10 – 1:50 – 1:250 – 1:6.250 – 1:31.250. Uma solução de Imunoglobulina intravenosa humana (IVig, Sanquin, lote 15D30H4560A) foi diluída em série em semilog de 1:10 até 1:10.000. As amostras e controles foram incubados junto do mutante de capsídeo apropriado ou do vetor wtAAV5 por 30' ± 5 minutos a 35 a 38 °C a uma MOI de 2.500 (conforme determinado anteriormente). Após 48 ± 2 horas, o reagente da luciferase foi adicionado, e a emissão de luminescência foi medida com o leitor de microplaca VictorX. As titulações de inibição de transdução foram determinadas como a diluição mais alta de soro ainda associado a uma atividade de neutralização detectável, isto é, uma atividade de neutralização >50%.

6.2 RESULTADOS

[0131] Conforme apresentado na tabela 3, 70% a 85% das amostras não contiveram os anticorpos neutralizantes contra wtAAV5 ou os 7 mutantes de capsídeo. A maioria das amostras compartilhou reatividade contra sete mutantes de capsídeo, deste modo, uma amostra de soro que tem reatividade contra o capsídeo AAV5 do tipo selvagem também reagiu contra outros capsídeos. Em termos do nível de resposta, estes também foram comparáveis entre mutantes de capsídeo. O número de amostras que não reagiu (ND = não detectado) é indicado para cada mutante de capsídeo. Estes dados são fornecidos como informações uma vez que é difícil comprar titulações com vetores diferentes. Em relação à amostra de soro de camundongo recolhida das articulações intra-articulares injetadas, esta apenas reagiu contra o capsídeo WT AAV5 que foi usado para imunizar os animais, embora nenhuma resposta tenha sido observada contra capsídeos mutantes (tabela 3). Todos os mutantes de capsídeo e WT AAV5 foram neutralizados por IVIg (titulações >100) (dados não mostrados).

TABELA 3: PARA CADA AMOSTRA DE SORO, ASSIM COMO O PLASMA DE CAMUNDONGO RECOLHIDO, A TITULAÇÃO DE INIBIÇÃO É RELATA E CORRESPONDENTE À DILUIÇÃO MAIS ALTA AINDA ASSOCIADA A UMA ATIVIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DETECTÁVEL. TITULAÇÕES > 8 SÃO CONSIDERADOS COMO SOROPOSITIVO. OS SINAIS POSITIVOS ESTÃO DESTACADOS EM NEGRITO/ITÁLICO. ND = NÃO DETECTÁVEL

	AAV5	AAV9A2	AAV-DJ-QR-P2	AAVrh10-A2	AAV1-P4	AAV2-P2	AAV7-A6	AAVrh10-A6
Amostra 1	256	256	256	256	>1024	256	>1024	>1024
Amostra 2	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 7	64	64	64	256	256	64	256	256
Amostra 8	16	16	16	64	16	64	64	64
Amostra 9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 10	4	4	16	4	64	64	64	64
Amostra 11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 12	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND
Amostra 13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 14	ND	1	ND	ND	4	1	ND	1
Amostra 15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

60/62

Amostra 16	1	1	4	4	4	16	1	1
Amostra 17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amostra 19	ND	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND
Amostra 20	4	256	64	4	ND	256	16	16
% de amostras negativas	85	80	75	85	80	70	75	75
Plasma do camundongo	256	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

[0132] A presente invenção foi descrita acima com referências a várias modalidades exemplificativas, conforme mostrado nos desenhos. As modificações e implantações de algumas partes ou elementos são possíveis e estão incluídas no escopo de proteção, conforme definido nas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírion de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) caracterizado pelo fato de que compreende uma proteína de capsídeo modificada para uso no tratamento ou prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica, em que a proteína de capsídeo modificada compreende, na parte C-terminal da proteína, uma sequência de aminoácidos Z, cujos resíduos são expostos na superfície da proteína de capsídeo.

2. Vírion de rAAV, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácidos Z:

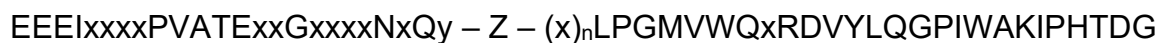
a. compreende ou consiste numa sequência de resíduos de aminoácido da fórmula I:



em que x representa um resíduo de aminoácido único e em que y representa 0, 1 ou 2 resíduos de aminoácido; e

b. está presente numa localização correspondente a uma posição 100 a 200, preferencialmente 120 a 180, mais preferencialmente 130 a 170, mais preferencialmente 140 a 160 de resíduos de aminoácido da terminação C de uma proteína de capsídeo de AAV do tipo selvagem.

3. Vírion de rAAV para uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência Z é compreendida na proteína de capsídeo modificada numa localização representada pela fórmula II:



a. em que Z, x e y são de acordo com a reivindicação 1; e

b. em que n é 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15.

4. Vírion de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a proteína de capsídeo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

i) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 1 e em que os aminoácidos nas posições 588 a 602 da SEQ ID NO: 1 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 11,

ii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 2 e em que os aminoácidos nas posições 585 a 599 da SEQ ID NO: 2 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 10,

iii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 3 e em que os aminoácidos nas posições 587 a 601 da SEQ ID NO: 3 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9,

iv) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 4 e em que os aminoácidos nas posições 586 a 600 da SEQ ID NO: 4 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 8,

v) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 5 e em que os aminoácidos nas posições 588 a 602 da SEQ ID NO: 5 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 9,

vi) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 6 e em que os aminoácidos nas posições 588 a 602 da SEQ ID NO: 6 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 8, e

vii) uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de aminoácidos que tem a SEQ ID NO: 7 e em que os aminoácidos nas posições 587 a 601 da SEQ ID NO: 7 têm pelo menos 80% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 12,

em que a proteína de capsídeo modificada fornece um aumento de pelo menos duas vezes em expressão, preferencialmente em células FLS humanas, em comparação com uma proteína de capsídeo não modificada com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 13 a 19, quando testado sob as mesmas condições, em que preferencialmente a proteína de capsídeo não modificada tem a sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 19 ou tem o mesmo serotipo que a proteína de capsídeo modificada.

5. Vírion de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações

anteriores, caracterizado pelo fato de que a proteína de capsídeo compreende ou consiste numa sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:1 a 7.

6. Vírion de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o vírion de rAAV compreende:

i) uma sequência de nucleotídeos que compreende pelo menos uma sequência de repetição terminal invertida (ITR) de AAV e

ii) uma sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse, em que preferencialmente a sequência de nucleotídeos que codifica um produto gênico de interesse está localizada entre duas sequências de ITR de AAV.

7. Vírion de rAAV para uso, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o produto gênico de interesse trata, previne ou suprime sintomas associados a uma doença artrítica, em que preferencialmente o produto gênico de interesse é selecionado do grupo que consiste em interleucinas, moduladores imunes, anticorpos, shRNA, miRNA, RNA-guia, fatores de crescimento, proteases, nucleotidasas/nucleosidasas, peptídeos, inibidores de protease, inibidores, enzimas e combinações dos mesmos, e em que mais preferencialmente o produto gênico de interesse é pelo menos um de CD39, CD73 e IFN- β .

8. Vírion de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o vírion de rAAV compreende pelo menos um dentre:

(i) um polinucleotídeo que compreende uma sequência que codifica pelo menos um RNA-guia; em que o ou cada RNA-guia é substancialmente complementar a uma sequência de polinucleotídeos alvo (ou sequências de polinucleotídeos alvo) num genoma; e

(ii) um polinucleotídeo que compreende uma sequência que codifica uma nuclease; em que a nuclease forma um complexo de ribonuclease com o RNA-guia, e em que o complexo de ribonuclease faz quebras de DNA de fita dupla sítio-específicas (DSDB) no genoma.

9. Composição de rAAV para uso no tratamento ou prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica caracterizada pelo fato de que a composição de rAAV

compreende um vírion de rAAV, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, e um carreador farmacologicamente aceitável.

10. Composição de rAAV para uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que a composição de rAAV compreende adicionalmente um capsídeo vazio numa razão entre capsídeo vazio e vírion de rAAV de pelo menos 1:1.

11. Composição de rAAV e um imunossupressor para uso no tratamento ou prevenção de uma doença artrítica ou para uso no tratamento ou prevenção de sintomas associados a uma doença artrítica caracterizada pelo fato de que a composição de rAAV é de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 ou 10, e em que o tratamento ou prevenção compreende a administração da composição de rAAV e a administração do imunossupressor a um indivíduo.

12. Vírion de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, uma composição de rAAV para uso, de acordo com a reivindicação 9 ou 10, ou uma composição de rAAV e um imunossupressor para uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a doença artrítica é selecionada do grupo que consiste em artrite reumatoide (RA), artrite reumatoide juvenil, osteoartrite (OA), gota, pseudogota, espondiloartrite (SpA), artrite psoriásica, espondilite anquilosante, artrite séptica, artrite, artrite idiopática juvenil, contusão, substituição de articulações e doença de Still.

13. Vírion de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 12, ou uma composição de rAAV para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9, 10 e 12, caracterizado pelo fato de que o vírion de rAAV ou a composição de rAAV é administrado de modo sistêmico e/ou local.

14. Composição de rAAV e um imunossupressor para uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dentre a composição de rAAV e o imunossupressor é administrado de modo local.

15. Vírion de rAAV ou uma composição de rAAV para uso, de acordo com a reivindicação 13, ou uma composição de rAAV e um imunossupressor para uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a administração local é administração intra-articular.

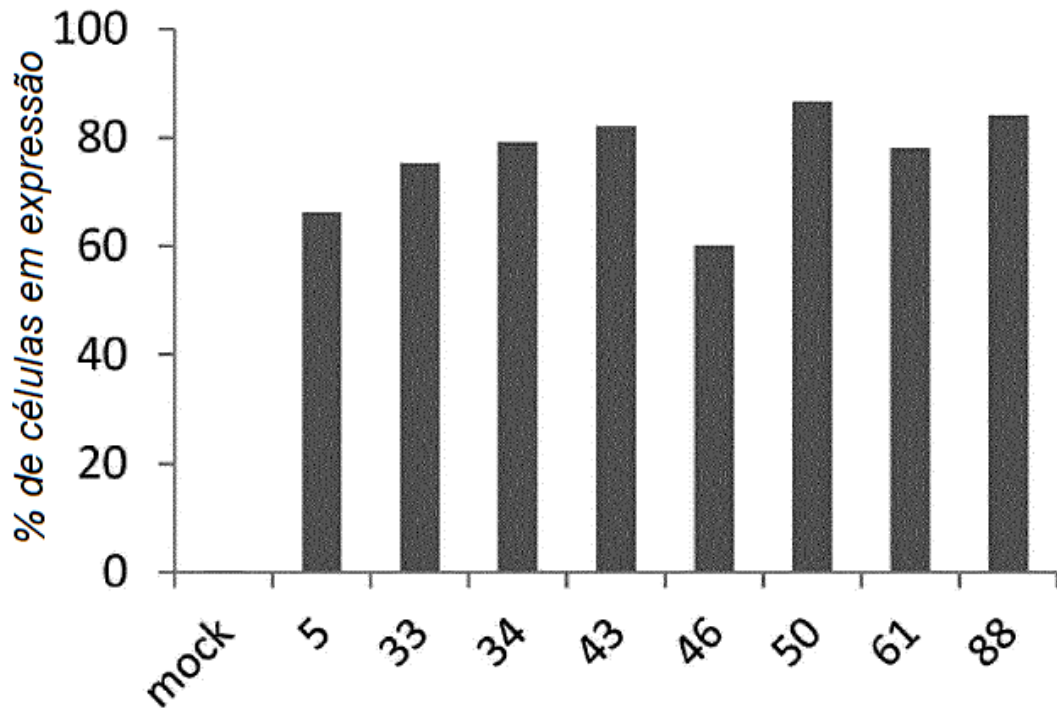
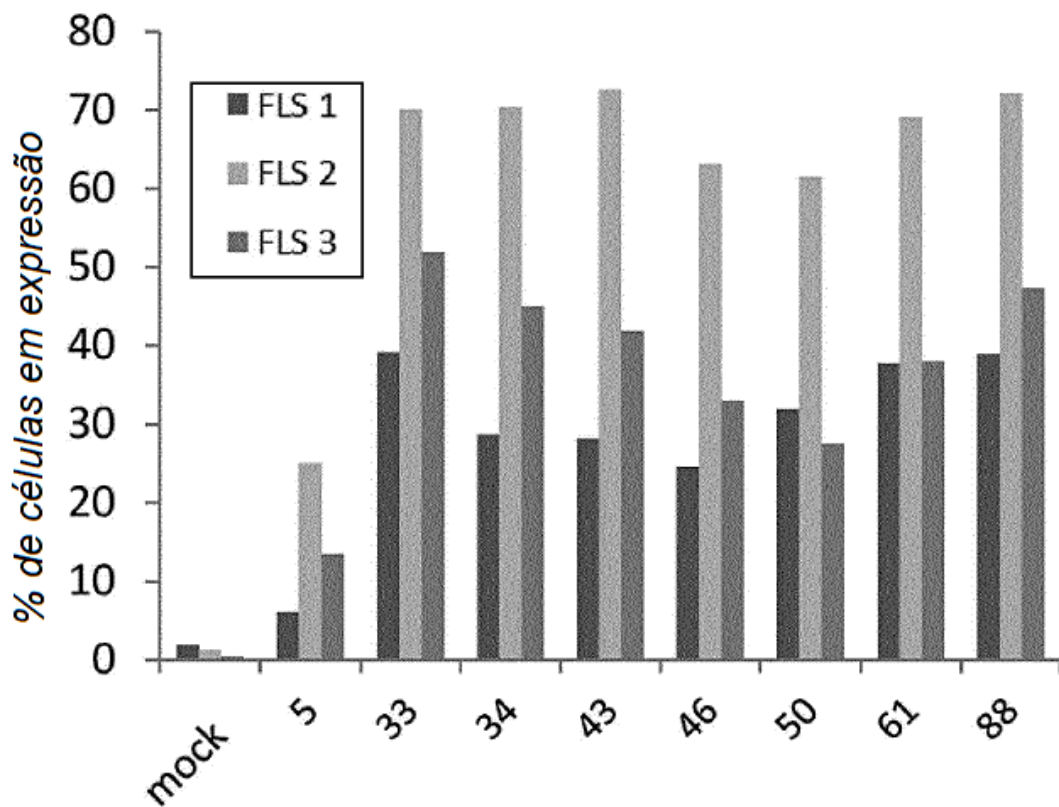
Fig. 1A**Fig. 1B**

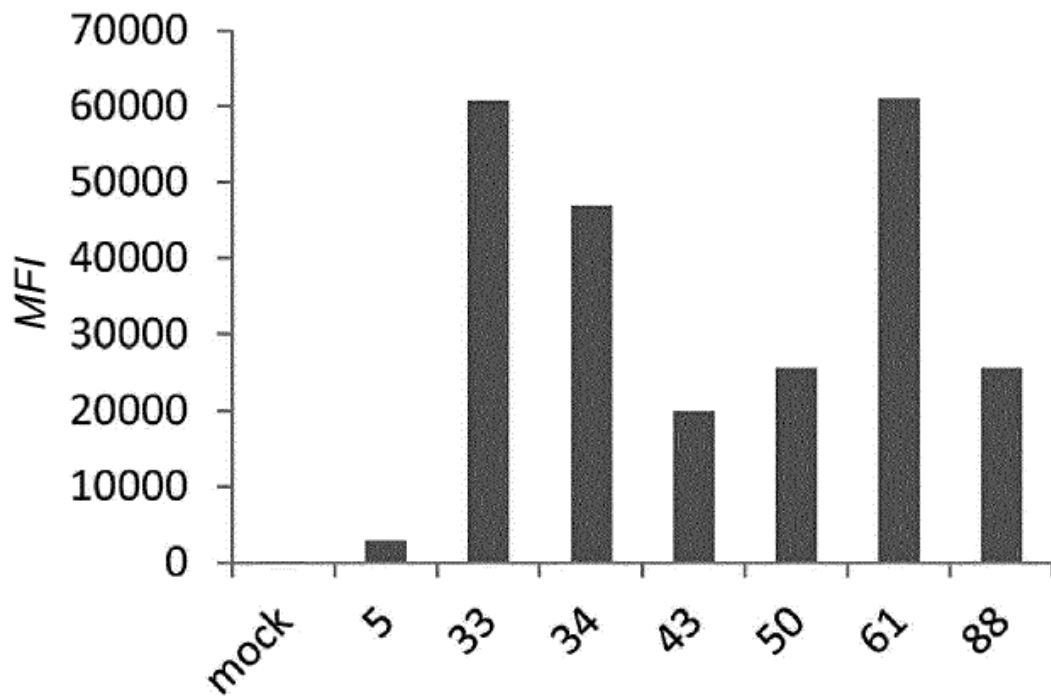
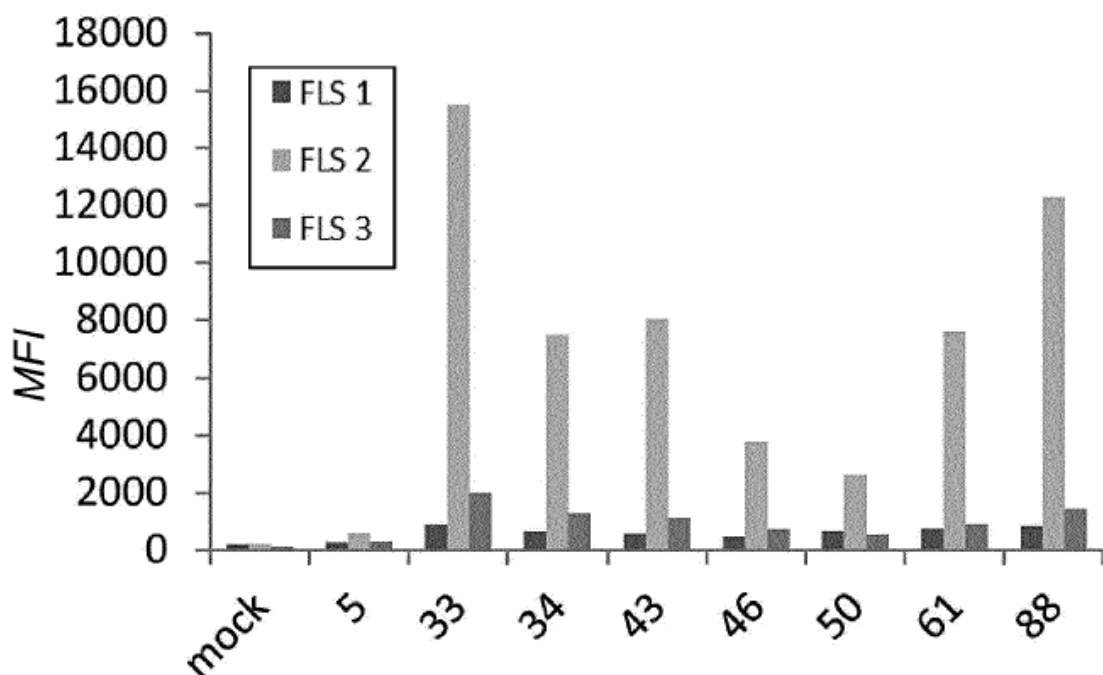
Fig. 1C*Fig. 1D*

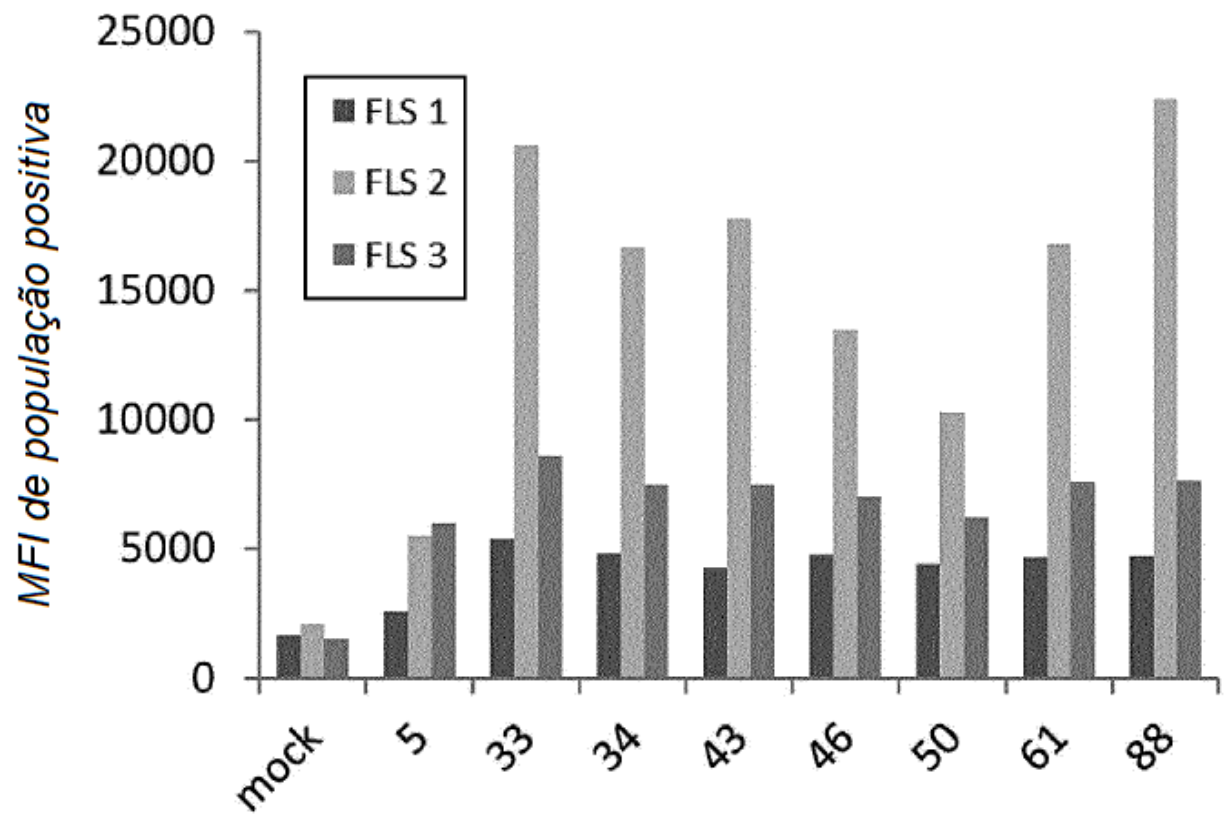
Fig. 1E

Fig. 2B

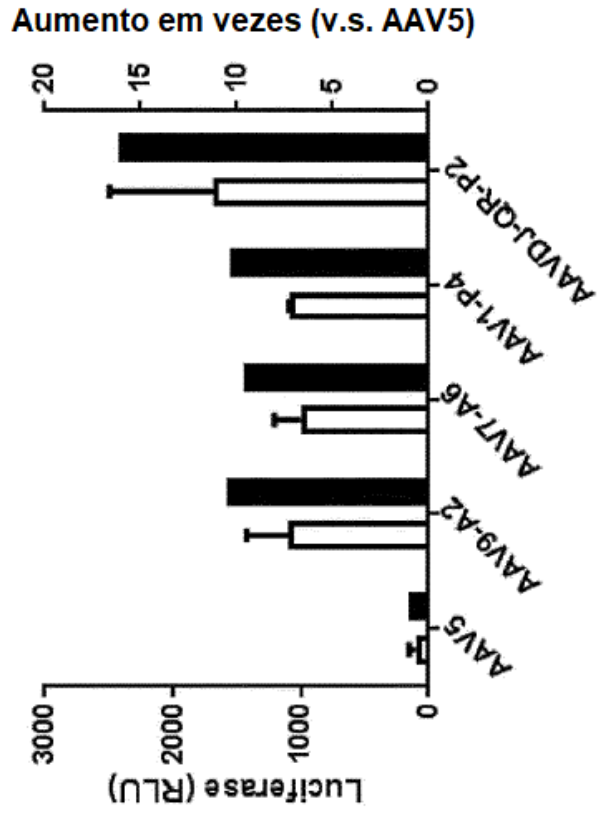


Fig. 2A

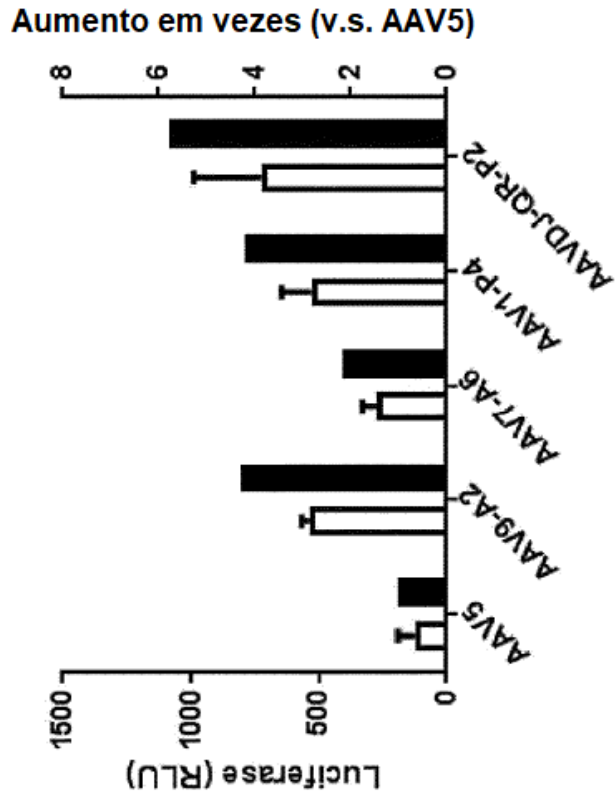


Fig. 2D

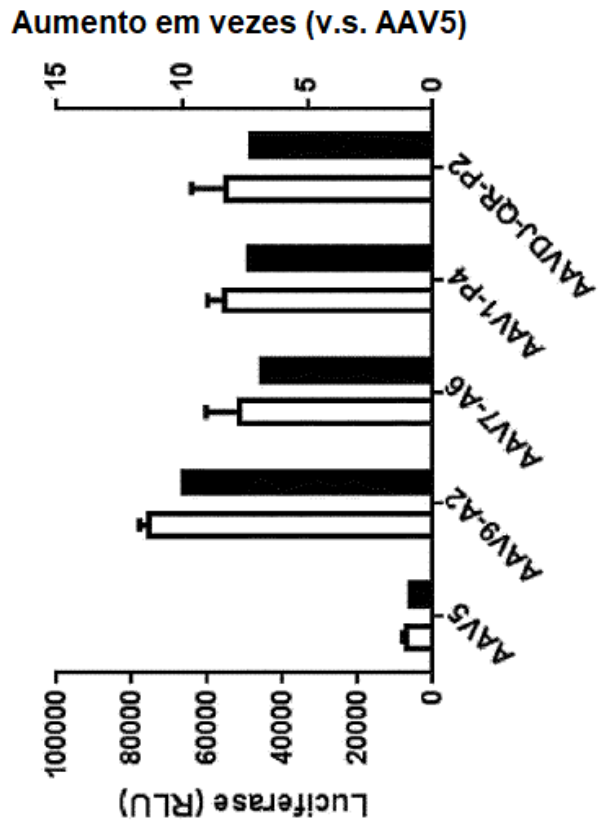


Fig. 2C

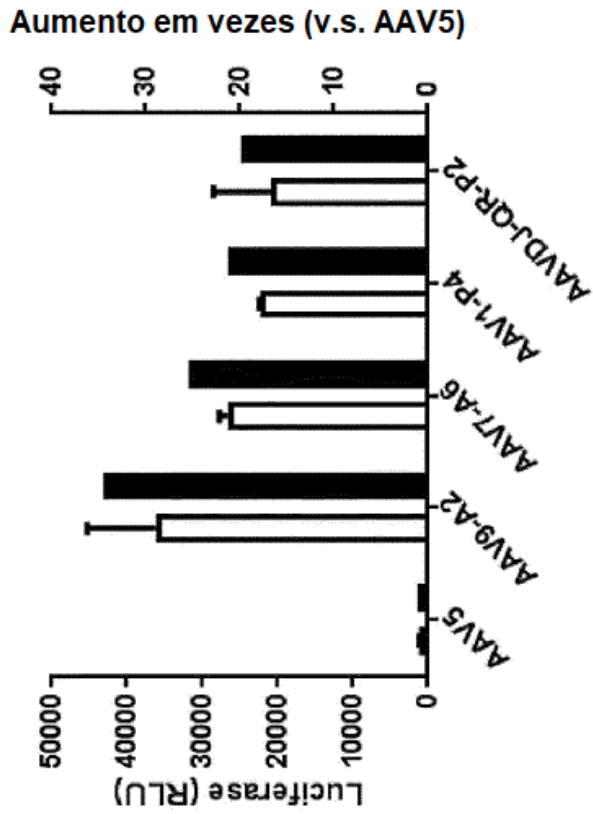


Fig. 2F

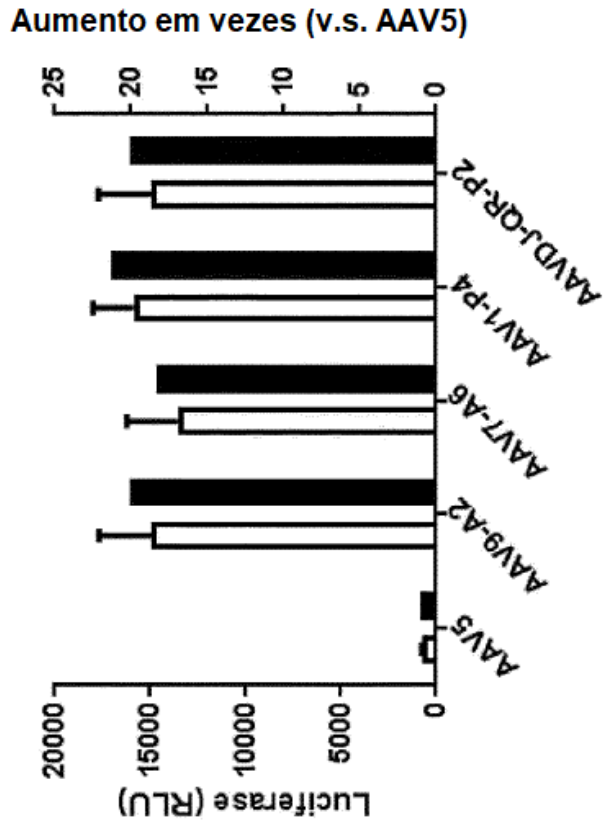


Fig. 2E

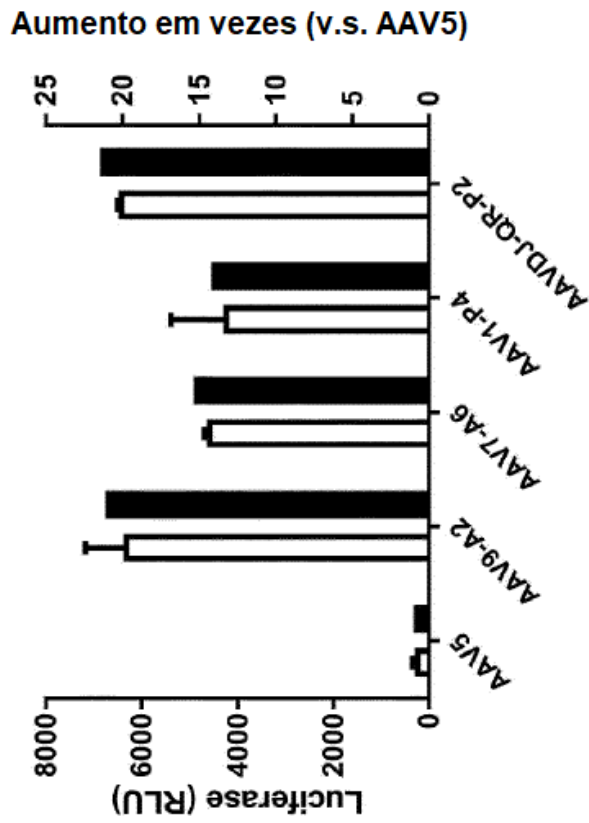


Fig. 2H

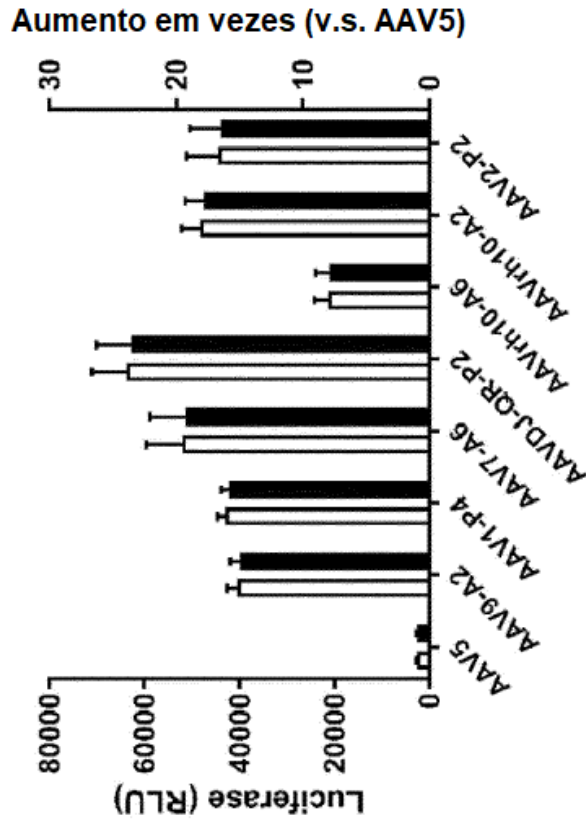


Fig. 2G

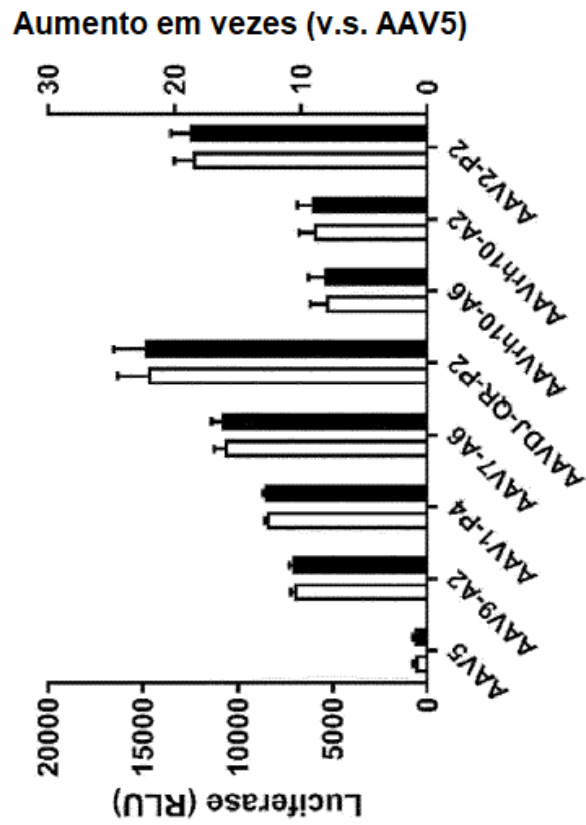


Fig. 2J

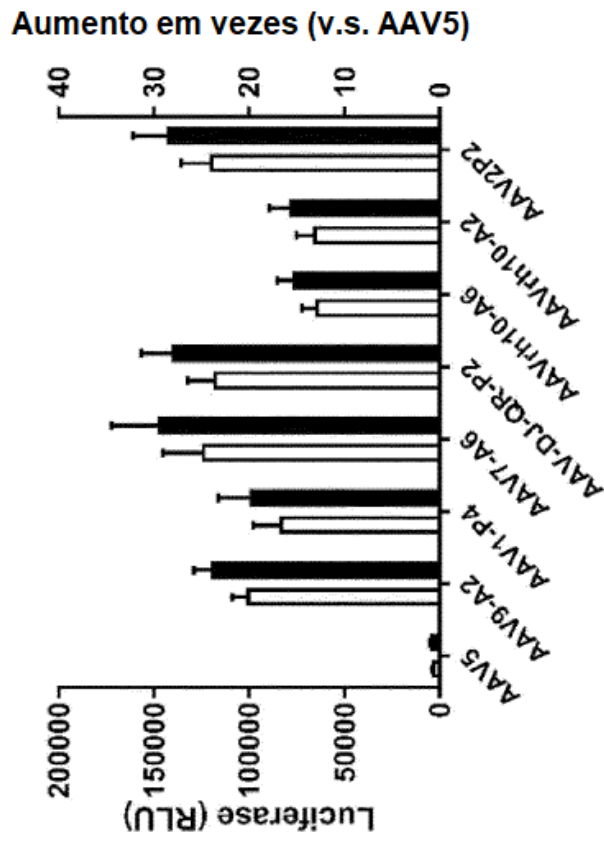
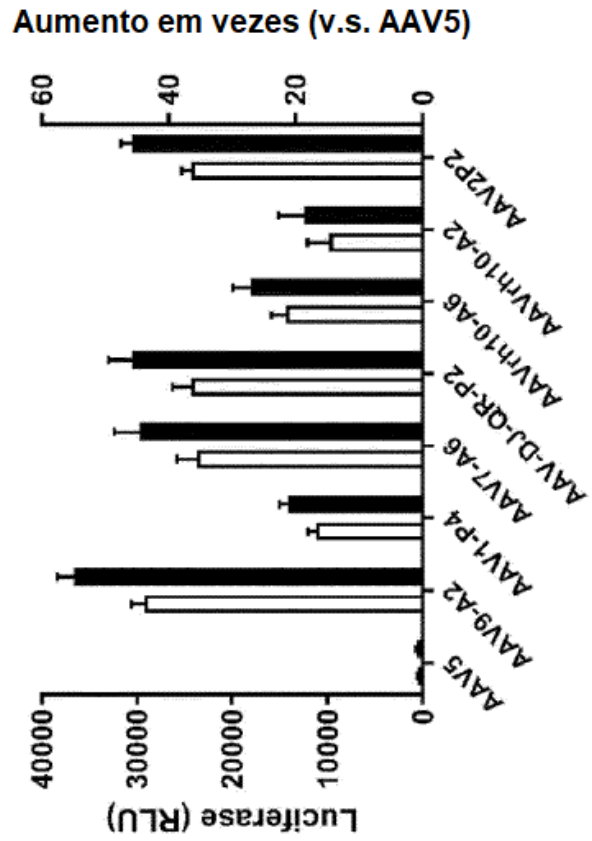


Fig. 2I



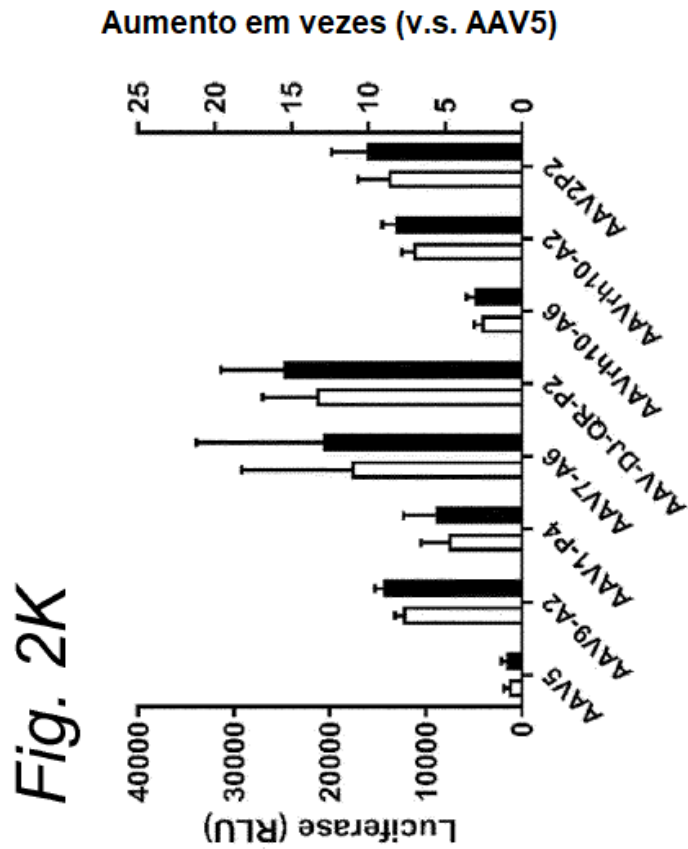
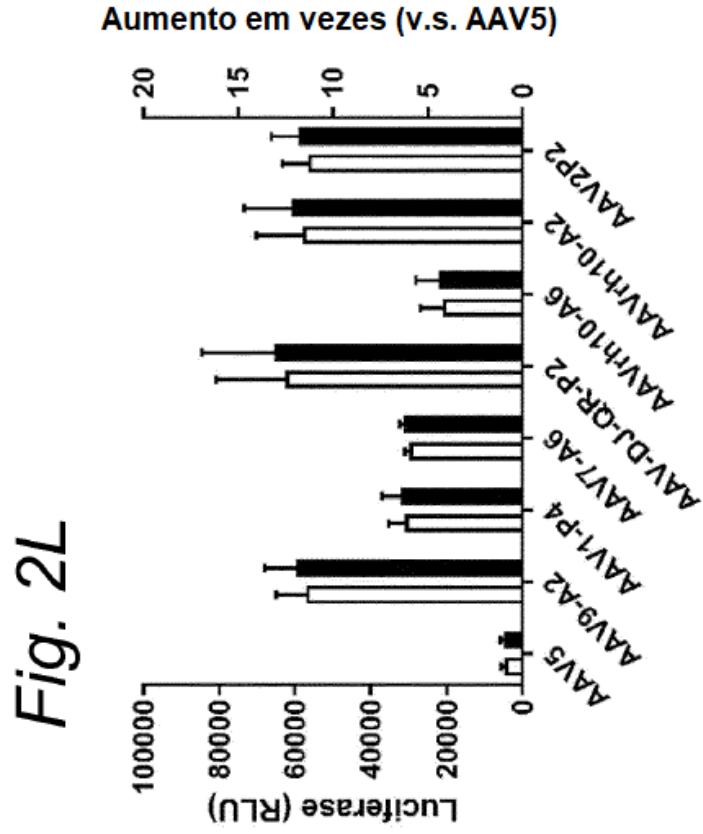


Fig. 2M

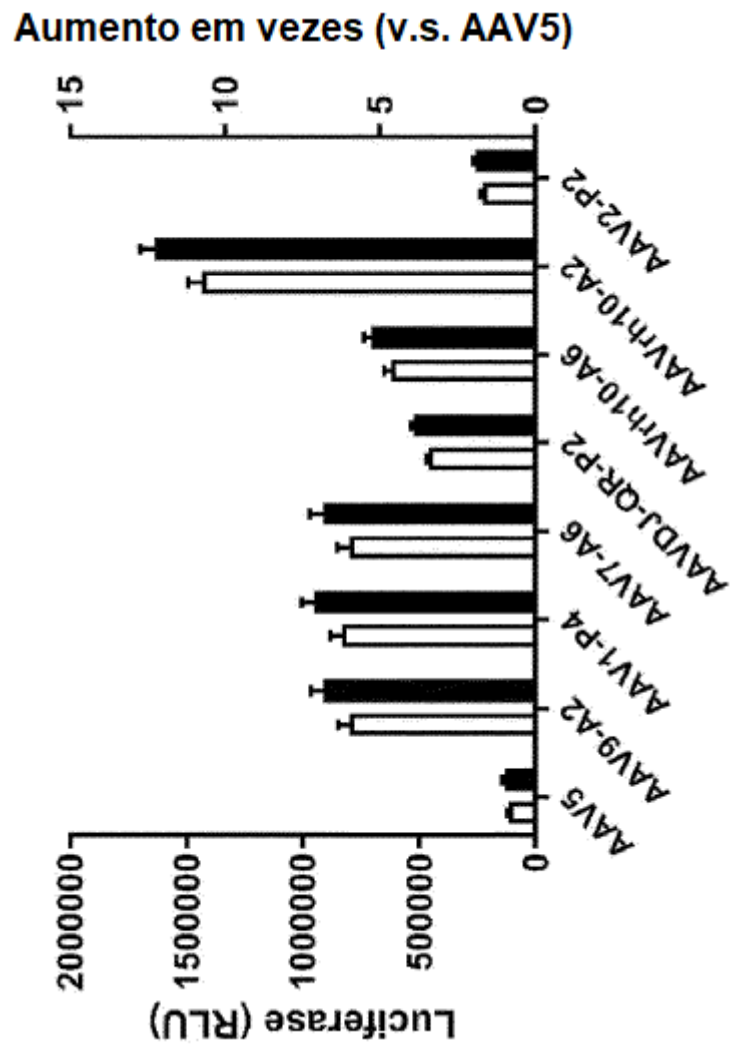


Fig. 3A

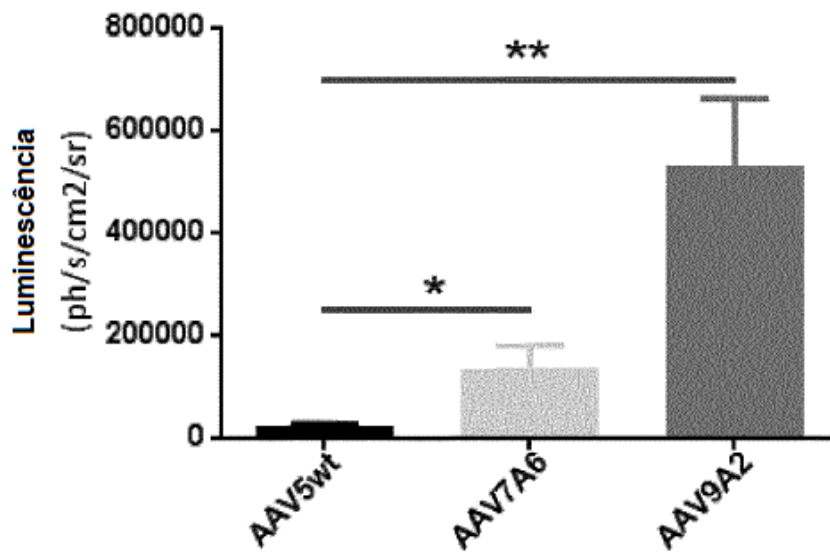


Fig. 3B

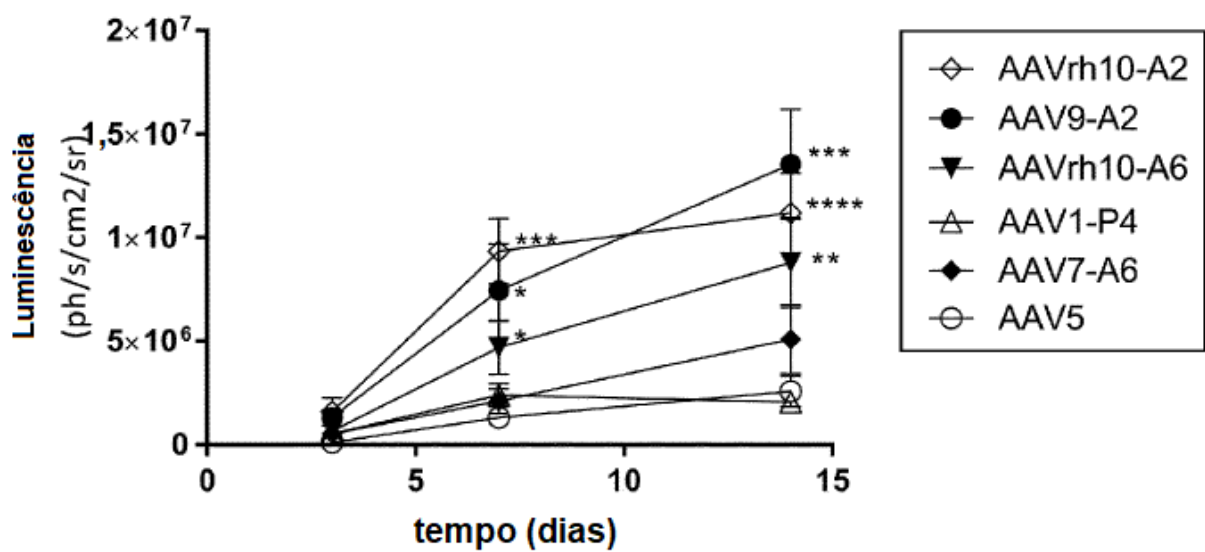
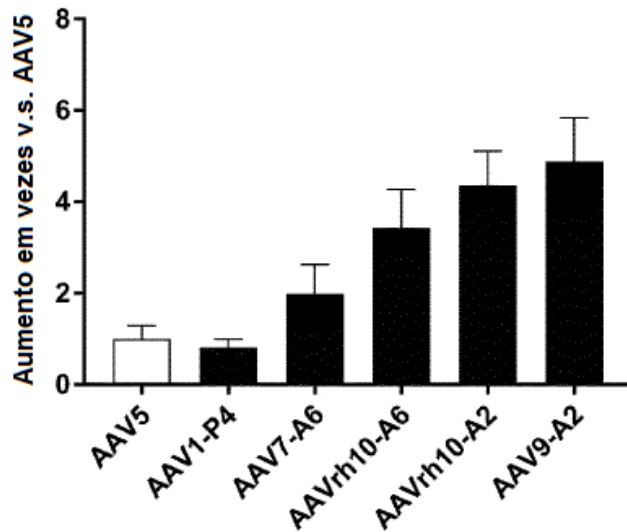


Fig. 3C*Fig. 4*

Alinhamento em formato CLUSTAL por MAFFT FFT-NS-i (v7.215)

```

AAV1P4          -gqsgndvrs--anaqaa
AAV9A2          -gqrgnysrg--vdaqaa
AAVrh10A2      -gqrgnysrg--vdaqaa
AAV7A6          -gqrgnearv--reaq--
AAV7A6+        -gqrgnearv--reaqaa
AAV10A6        -gqrgnearv--reaqaa
AAV2P2         qqqsgcdcrqdcfca---
AAV-DJ-QR-P2  qqqrgcdcrqdcfca---
AAV2P2+        qqqsgcdcrqdcfcaqaa
AAV-DJ-QR-P2+ qqqrgcdcrqdcfcaqaa
                ** *   *   *

```

Fig. 5

Alinhamento de sequência múltipla CLUSTAL por MUSCLE (3.8)

```

AAV2P2          QGQSGCDCRG-DCFCA---
AAV2P2+        QGQSGCDCRG-DCFCAQAA
AAV-DJ-QR-P2   QGQSGCDCRG-DCFCA---
AAV-DJ-QR-P2+ QGQSGCDCRG-DCFCAQAA
AAV1P4         -GQSGNDVRSANAQAA---
AAV9A2        -GQRGNYSRGVDAQAA---
AAVrh10A2     -GQRGNYSRGVDAQAA---
AAV7A6        -GQRGNEARVREAQ-----
AAV7A6+       -GQRGNEARVREAQAA---
AAV10A6       -GQRGNEARVREAQAA---
                ** *   *   :.

```

Fig. 6

Alinhamento em formato CLUSTAL por MAFFT FFT-NS-i (v7.215)

```

insertoP4      -gqsgndvrs--anaqaa
insertoA2     -gqrgnysrg--vdaqaa
insertoA6     -gqrgnearv--reaqaa
insertoP2     qgqsgcdcrqdcfcaqaa
insertoQR-P2  qgqrgcdcrqdcfcaqaa
                ** *   *   ****

```

Fig. 7

Alinhamento de sequência múltipla CLUSTAL por MUSCLE (3.8)

```
insertoP2      QGQSGCDCRGDCFCAQAA
insertoQR-P2   QGQRGCDCRGDCFCAQAA
insertoP4      -GQSGNDVRS--NAQAA
insertoA2      -GQRGNYSRGV--DAQAA
insertoA6      -GQRGNEARVR--EAQAA
                ** *      *      ****
```

RESUMO

“PROTEÍNA DE CAPSÍDEO DE RAAV MODIFICADA PARA TERAPIA GÊNICA”

A invenção se refere a vírions de vírus adenoassociado recombinante (rAAV) para terapia gênica, em que os vírions de rAAV compreendem uma proteína de capsídeo inovadora. Em particular, a invenção se refere ao uso de tais vírions em terapia gênica para o tratamento de uma doença artrítica, como, por exemplo, artrite reumatoide ou sintomas da mesma, preferencialmente por administração intra-articular.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 202000840 LISTAGEM.txt
- Data de Geração do Código: 15/09/2020
- Hora de Geração do Código: 13:50:15
- Código de Controle:
 - Campo 1: 69E44DDCE48A09FE
 - Campo 2: AC919A8934096B50