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

(11) BR 112013021494-5 B1

(22) Data do Depósito: 21/02/2012

(45) Data de Concessão: 08/09/2021

(54) Título: VETOR VIRAL, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, USO DE UM VÍRUS ADENO-ASSOCIADO (AAV) RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUZIR O MESMO

(51) Int.Cl.: C12N 15/83; A61K 39/395; C12N 15/11.

(30) Prioridade Unionista: 14/02/2012 US 61/598,728; 21/10/2011 US 61/550,123; 22/02/2011 US 61/445,449.

(73) Titular(es): CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY.

(72) Inventor(es): ALEJANDRO BENJAMIN BALAZS; DAVID BALTIMORE.

(86) Pedido PCT: PCT US2012025970 de 21/02/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/115980 de 30/08/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/08/2013

(57) Resumo: LIBERAÇÃO DE PROTEÍNAS USANDO VETORES DE VÍRUS ADENO-ASSOCIADO (AAV) Composições, sistemas e método para a liberação de proteínas de interesse usando vetores de vírus adeno-associado (AAV) são divulgados neste relatório.

“VETOR VIRAL, POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, USO DE UM VÍRUS ADENO-ASSOCIADO (AAV) RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUZIR O MESMO”

PEDIDOS RELACIONADOS

[001]O presente pedido reivindica prioridade sob 35 U.S.C. § 119(e) aos Pedidos Provisórios U.S. Nºs 61/445.449, depositado em 22 de Fevereiro de 2011; 61/550.123, depositado em 21 de Outubro de 2011; e 61/598.728, depositado em 14 de Fevereiro de 2012. Estes pedidos de prioridade são integral e expressamente incorporados como referência neste relatório.

DECLARAÇÃO PATROCINADA PELO GOVERNO FEDERAL

[002]Esta invenção foi feita com o apoio do governo sob HHSN266200500035C concedido pelo National Institutes of Health. O governo tem certos direitos na invenção.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[003]O presente pedido foi depositado juntamente com uma Listagem de Sequências no formato eletrônico. A Listagem de Sequências é fornecida como um arquivo intitulado SEQLISTING.TXT, criado em 21 de Fevereiro de 2012, o qual apresenta 148 Kb. A informação no formato eletrônico da Listagem de Sequências é incorporada integralmente neste relatório como referência.

Fundamentos

Campo da Invenção

[004]O presente pedido se refere, em geral, aos campos de imunologia e liberação de genes. Mais particularmente, o pedido se refere a composições, sistemas e métodos para produzir proteínas de interesse, tais como anticorpos.

Descrição da Técnica Relacionada

[005]Não obstante os esforços significativos, nenhuma vacina eficaz foi desenvolvida para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) até agora. Muitos

anticorpos foram identificados como capazes de neutralizar cepas de HIV mais circulantes. Embora esforço substancial tenha focado no projeto de imunógenos capazes de induzir anticorpos *de novo* que alvejariam epítopos similares, permanece incerto se uma vacina convencional será capaz de induzir análogos dos anticorpos neutralizantes amplamente existentes. Como uma alternativa à imunização, a transferência de genes mediada por vetor descrita neste relatório pode ser usada para criar secreção dos anticorpos neutralizantes amplamente existentes na circulação.

[006]Métodos existentes voltados para a produção de proteínas terapêuticas geneticamente codificadas resultam apenas em níveis limitados de expressão de genes. Por exemplo, esforços prévios para criar imunidade humoral usando vetores com base em vírus adeno-associado (AAV) resultaram em produção de anticorpo modesta (Lewis *et al*., J. Virol. 76: 8769-8775 (2002)), que foi subsequentemente aperfeiçoada através do uso de capsídeos alternativos (Fang *et al*. Nature Biotechnol., 23: 584-590 (2005)) e vetores de AAV autocomplementares (scAAV) (McCarty., Mol. Ther., 16: 1648-1656 (2008)) que aumentam a expressão no gasto de capacidade de carga. Recentemente, vetores de scAAV foram usados para direcionar a expressão das imunoadesinas neutralizantes do vírus da imunodeficiência símia (SIV) consistindo em fragmentos de anticorpos pequenos e artificialmente fundidos (Johnson *et al*., Nature Med., 15(8): 901-906 (2009)). Entretanto, a eficácia desta profilaxia foi limitada por uma resposta imune endógena dirigida contra as proteínas de imunoadesina. Além disso, a falta de eficácia dos métodos com base em AAV existentes pode ser atribuída à incapacidade de os vetores de AAV transmitirem sequências maiores do que aproximadamente 4800 pares de base no comprimento. Dong *et al*., Human Gene Therapy, 7:2101 - 2112 (1996). Esta limitação dos vetores de AAV torna difícil projetar vetores contendo um gene que codifica uma proteína terapêutica, assim como elementos promotores de expressão para levar em consideração altos níveis de produção, particularmente *in vivo*. Portanto, existe uma

necessidade urgente quanto ao desenvolvimento de vetores compactos e sistemas capazes de expressar genes eficazmente.

Sumário

[007]Algumas modalidades divulgadas neste relatório fornecem um vetor viral, onde o vetor viral compreende: uma repetição terminal invertida 5’ (ITR) de vírus adeno-associado (AAV) e uma ITR de AAV 3’; um promotor; um sítio de restrição a jusante do promotor para permitir a inserção de um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse, e um elemento regulador pós-transcricional a jusante do sítio de restrição, onde o promotor, o sítio de restrição e o elemento regulador pós-transcrição estão localizados a jusante da ITR de AAV 5’ e a montante da ITR de AAV 3’.

[008]Em algumas modalidades, o vetor viral compreende ainda um polinucleotídeo inserido no sítio de restrição e ligado de maneira operável ao promotor, onde o polinucleotídeo compreende uma região codificante de uma proteína de interesse.

[009]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de peptídeo sinal imediatamente a montante da região codificante da proteína de interesse. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal é selecionado a partir do grupo que consiste de um peptídeo sinal de interferon, um peptídeo sinal do hormônio de crescimento humano, um peptídeo sinal de eritropoietina (EPO), um peptídeo sinal do fator estimulante da colônia de granulócitos (G-CSF), um peptídeo sinal de insulina, e qualquer combinação dos mesmos.

[0010]Em algumas modalidades, o vetor viral compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 90 % de identidade de sequência, ou mais à sequência consenso de Kozak.

[0011]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é selecionada a partir do grupo que consiste de anticorpos de comprimento total, hormônios de crescimento

(GHs), fatores de crescimento tipo insulina (IGFs), G-CSFs, eritropoietinas (EPOs), insulinas, fragmentos de anticorpo Fab, fragmentos de anticorpo scFV, proteínas de coagulação relacionadas à hemofilia, distrofina, ácido lipase lisossomal, fenilalanina hidroxilase (PAH), enzimas relacionadas à doença de armazenamento de glicogênio, e quaisquer variantes dos mesmos.

[0012]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é um anticorpo neutralizante de vírus. Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante de vírus é um anticorpo neutralizante para um vírus da imunodeficiência humana (HIV), um vírus da hepatite C (HCV), ou um vírus da influenza. Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante para HIV é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, e qualquer variante dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante para HCV é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B, anticorpo anti-HCV AR4A, e qualquer variante dos mesmos. Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante para o vírus da influenza é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-influenza F10, anticorpo anti-influenza CR6261, anticorpo anti-influenza FI6, anticorpo anti-influenza TCN32, e qualquer variante dos mesmos.

[0013]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é um anticorpo neutralizante para malária.

[0014]Em algumas modalidades, o promotor compreende promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMV), promotor beta-actina da galinha (CAG), promotor de ubiquitina C (UBC), ou qualquer variante dos mesmos. Em algumas modalidades, o promotor compreende um doador de *splice*, um aceitante de *splice*, ou qualquer variante dos mesmos. Em algumas modalidades, o doador de *splice* compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 90 % de identidade de sequência à SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, o aceitante de *splice* compreende uma sequência

de nucleotídeos tendo pelo menos 90 % de identidade de sequência à SEQ ID NO: 6. Em algumas modalidades, o promotor compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 90 % de identidade de sequência à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o promotor compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 90 % de identidade de sequência a qualquer uma entre SEQ ID NOs: 2 a 4.

[0015]Em algumas modalidades, o elemento regulador pós-transcricional é um elemento regulador pós-transcricional viral. Em algumas modalidades, o elemento regulador pós-transcricional viral é elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite de marmota (WPRE), elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite B (HBVPRE), elemento de transporte de RNA (RTE), ou qualquer variante dos mesmos.

[0016]Em algumas modalidades, o vetor viral compreende ainda uma região de terminação de transcrição a jusante do elemento regulador pós-transcricional. Em algumas modalidades, a região de terminação de transcrição compreende uma sequência poli(A) tardia de SV40, uma sequência poli(A) de beta-globina de coelho, uma sequência poli(A) de hormônio de crescimento bovino, ou qualquer variante dos mesmos.

[0017]Em algumas modalidades, o promotor compreende um íntron. Em algumas modalidades, o íntron é um íntron sintético compreendendo uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos 90 % de identidade de sequência à SEQ ID NO: 8.

[0018]Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma primeira região codificante para a região variável de cadeia pesada de uma imunoglobulina e uma segunda região codificante para a região variável de cadeia leve da imunoglobulina. Em algumas modalidades, a primeira região codificante e a segunda região codificante são separadas por uma sequência 2A. Em algumas modalidades, a sequência 2A é uma sequência F2A.

[0019]Em algumas modalidades, 5’ da primeira região codificante é fundida

com uma primeira sequência de peptídeo sinal e 5’ da segunda região codificante é fundida com uma segunda sequência de peptídeo sinal. Em algumas modalidades, a primeira sequência de peptídeo sinal e a segunda sequência de peptídeo sinal são diferentes.

[0020]Em algumas modalidades, a região partindo da ITR 5’ e terminando na ITR 3’ apresenta pelo menos cerca de 2,5 kb.

[0021]Algumas modalidades neste relatório fornecem um método para produzir uma proteína de interesse *in vivo*, onde o método compreende: fornecer um vírus adeno-associado (AAV) recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse; e administrar o AAV recombinante ao paciente, por meio do qual AAV recombinante expressa o anticorpo no paciente, em que o nucleotídeo apresenta pelo menos cerca de 1,4 kb.

[0022]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é um anticorpo. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de comprimento total. Em algumas modalidades, o anticorpo é selecionado a partir do grupo que consiste de anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, anticorpo anti-influenza F10, anticorpo anti-influenza FI6, anticorpo influenza TCN32, anticorpo anti-influenza CR6261, anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B, anticorpo anti-HCV AR4A, anticorpo anti-malária, e qualquer variante dos mesmos.

[0023]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 9 μg/ml. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 100 μg/ml. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 500 μg/ml.

[0024]Em algumas modalidades, o AAV recombinante é produzido através do fornecimento de uma linhagem celular de empacotamento com um vetor viral, funções

auxiliares para gerar uma infecção de AAV produtiva, e genes cap de AAV, onde o vetor viral compreende uma repetição terminal invertida de AAV 5’ (ITR), uma ITR de AAV 3’ e uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse; e recuperar um vírus AAV recombinante a partir do sobrenadante da linhagem celular de empacotamento.

[0025]Em algumas modalidades, o vetor viral é o vetor viral de qualquer um entre os vetores virais divulgados neste relatório.

[0026]Algumas modalidades divulgadas neste relatório fornecem um método para reduzir ou inibir o risco de infecção de um vírus em um paciente, onde o método compreende: fornecer um vírus adeno-associado (AAV) recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo neutralizante para o vírus; e administrar o AAV recombinante ao paciente, por meio do qual o AAV recombinante expressa o anticorpo no paciente.

[0027]Em algumas modalidades, o método compreende ainda fornecer um segundo AAV recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um segundo anticorpo neutralizante para o vírus.

[0028]Em algumas modalidades, o paciente é um mamífero. Em algumas modalidades, o paciente é um ser humano.

[0029]Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante é um anticorpo de comprimento total.

[0030]Em algumas modalidades, o método reduz o risco de infecção no paciente em pelo menos cerca de 5 vezes em comparação aos pacientes sem o tratamento com o vetor viral. Em algumas modalidades, o método reduz o risco de infecção no paciente em pelo menos cerca de 20 vezes em comparação aos pacientes sem o tratamento com o vetor viral. Em algumas modalidades, o método inibe a infecção viral no paciente.

[0031]Em algumas modalidades, o anticorpo é expresso no soro do paciente

na quantidade de pelo menos cerca de 9 µg/ml. Em algumas modalidades, o anticorpo é expresso no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 100 µg/ml. Em algumas modalidades, o anticorpo é expresso no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 500 µg/ml.

[0032]Em algumas modalidades, o vírus é um vírus da imunodeficiência humana (HIV), um vírus da hepatite C (HCV), ou um vírus da influenza.

[0033]Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante é selecionado a partir do grupo que consiste de anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, anticorpo anti-influenza F10, anticorpo anti-influenza CR6261, anticorpo influenza TCN32, anticorpo anti-influenza FI6, anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B, anticorpo anti-HCV AR4A, e qualquer variante dos mesmos.

[0034]Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado ao paciente através de injeção intramuscular, injeção intravaginal, injeção intravenosa, injeção intraperitoneal, injeção subcutânea, administração epicutânea, administração intradérmica, ou administração nasal.

[0035]Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado ao paciente no máximo uma vez a cada ano. Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado ao paciente no máximo uma vez a cada 5 anos. Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado ao paciente no máximo uma vez a cada 10 anos.

[0036]Algumas modalidades divulgadas neste relatório fornecem um método para produzir um vírus adeno-associado (AAV) recombinante, onde o método compreende: fornecer uma linhagem celular de empacotamento com um constructo viral compreendendo repetição terminal invertida de AAV 5’ (ITR) e ITR de AAV 3’, funções auxiliares para gerar uma infecção de AAV produtiva, e genes cap de AAV; e recuperar um vírus AAV recombinante a partir do sobrenadante da linhagem celular

de empacotamento.

[0037]Em algumas modalidades, os genes cap de AAV codificam um capsídeo a partir do sorotipo 1, sorotipo 2, sorotipo 4, sorotipo 5, sorotipo 6, sorotipo 7, sorotipo 8, sorotipo 9, ou uma variante dos mesmos.

[0038]Em algumas modalidades, o constructo viral é qualquer um entre os vetores virais divulgados neste relatório.

[0039]Em algumas modalidades, o AAV recombinante não é um AAV autocomplementar (scAAV).

[0040]Algumas modalidades divulgadas neste relatório fornecem um polinucleotídeo isolado, sintético ou recombinante, onde o polinucleotídeo compreende: uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90 % ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o polinucleotídeo compreende uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir da SEQ ID NOs: 2 a 4.

Breve Descrição dos Desenhos

[0041]A Figura 1A é um gráfico que mostra as atividades de luciferase 15 semanas depois da injeção intramuscular de 2×10^9 GC de vetores AAV2/8 expressando luciferase a partir de um painel de promotores (n = 2). A Figura 1B é uma apresentação esquemática de uma modalidade do promotor de CASI combinando o acentuador de CMV e promotor de β-actina de galinha, seguido por um doador de *splice* (SD) e aceitante de *splice* (SA) flanqueando a região acentuadora de ubiquitina. A Figura 1C é um gráfico que mostra as atividades de luciferase a partir dos vetores de AAV direcionados por CASI em comparação ao CMV convencional e promotores CAG 8 semanas depois da injeção intramuscular de 1×10^9 GC de AAV2/8 que codifica luciferase direcionada pelo promotor indicado (n = 2). A Figura 1D é um gráfico que mostra atividades de luciferase 6 semanas pós-administração de vetores de AAV direcionados por CMV com ou sem WPRE, terminados pelo sinal de poliadenilação

indicado (n = 2). A Figura 1E é um apresentação esquemática de um cassete de expressão para a expressão do anticorpo compreendendo as repetições terminais invertidas (ITR), o promotor de CASI, uma cadeia pesada de IgG1 ligada à cadeia leve capa separada por uma sequência 2A de autoprocessamento, um WPRE para expressão aperfeiçoada, e sinal de poliadenilação tardio de SV40. As regiões V do anticorpo de cadeias pesadas e leves são clonadas no vetor nas posições indicadas em caixas preenchidas.

[0042]A Figura 2 é uma representação esquemática de uma modalidade do vetor de AAV que está no escopo do presente pedido.

[0043]A Figura 3A é um gráfico de barras que mostra a comparação de expressão do anticorpo *in vitro* por ELISA, após transfecção com vetores portadores do transgene de anticorpo mostrado acima com padrão ou sequências F2A otimizadas que incluem um sítio de clivagem de furina. A Figura 3B é um gráfico de barras que mostra a comparação da expressão do anticorpo 4E10 *in vitro* por ELISA, após transfecção com vetores portadores de 4E10 com peptídeos sinais naturais ou derivados de hormônio de crescimento humano (HGH) fundidos ao gene de cadeia pesada, ao gene de cadeia leve ou os dois genes. A Figura 3C é um gráfico de barras que mostra a comparação da expressão do anticorpo 4E10 *in vitro* por ELISA, após transfecção com vetores portadores de 4E10 no cassete de expressão padrão ou um cassete em que os doadores e aceitantes de *splice* foram modificados para reduzir o potencial quanto ao *splicing* estranho. A Figura 3D é uma apresentação esquemática de um transgene de IgG1 exemplar que foi otimizado para a expressão *in vitro*. Realçadas estão as sequências sinais de cadeia pesada e leve (“SS”), o peptídeo de autoprocessamento de F2A (“F2A”) e os sítios doadores e aceitantes de *splice* prognosticados (linhas cheias na “Região Constante de Cadeia Pesada” e “Constante Capa”).

[0044]A Figura 4A-D mostra a neutralização de HIV através de anticorpos

expressados a partir de um transgene de expressão otimizada: b12 (Fig. 4A), 2G12 (Fig. 4B), 4E10 (Fig. 4C) e 2F5 (Fig. 4D) (n = 3, RLU = Unidades Relativas de luciferase).

[0045]A Figura 5A mostra imagens de Xenogen de um camundongo Rag2/γc representativo 15 semanas depois da injeção intramuscular de 1×10^{10} cópias de genoma de AAV2/8 expressando luciferase. A Figura 5B é um gráfico que mostra a quantificação da atividade da luciferase por imagem de Xenogen de camundongos $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ que recebem injeção intramuscular de 1×10^{10} ou 1×10^{11} GC de AAV2/8 que codifica luciferase demonstra expressão dose-dependente a longo prazo (n = 2). A Figura 5C é um gráfico que mostra a concentração da IgG humana na circulação, conforme medido por ELISA de IgG humana total em amostras de soro tomadas depois da injeção intramuscular de 1×10^{10} ou 1×10^{11} GC de AAV2/8 expressando 4E10-IgG1 em camundongos $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ (n = 2).

[0046]A Figura 6 é um gráfico que mostra a quantificação de IgG humana através de ELISA depois da injeção intramuscular de 1×10^{11} cópias de genoma do vetor de expressão otimizado produzindo b12-IgG em NOD/SCID/γc imunodeficiente (NSG) e Rag2/γc (Rag2) ou camundongos C57BL/6 (B6) e Balb/C imunocompetentes (o gráfico mostra média e erro padrão, n = 4).

[0047]A Figura 7 é um gráfico que mostra a depleção de células CD4 em camundongos humanizados HuPBMC-NSG, após desafio com HIV.

[0048]A Figura 8A é gráfico que mostra a concentração de IgG humana na circulação, conforme medido por ELISA em amostras de soro tomadas 6 semanas depois da injeção intramuscular do vetor que expressa luciferase ou b12-IgG (ND, não detectado). A Figura 8B mostra a depleção de células T CD4 em camundongos humanizados depois do desafio intraperitoneal com 10 ng de p24 NL4 - 3 em animais que receberam vetores AAV2/8 expressando luciferase (gráfico esquerdo) ou b12-IgG1 (gráfico direito) 6 semanas antes (n = 6).

[0049]A Figura 9 mostra uma comparação de proteção mediada por vários anticorpos contra HIV amplamente neutralizantes. A Figura 9A mostra a concentração de anticorpo na circulação, conforme medido por ELISA de IgG humana total em amostras de soro tomadas depois da injeção intramuscular de vetores expressando quatro anticorpos contra HIV amplamente neutralizantes (n = 8). A Figura 9B mostra a comparação da eficácia relativa de quatro anticorpos contra HIV amplamente neutralizantes em proteger camundongos humanizados huPBMC-NSG contra depleção de células CD4 depois do desafio com HIV intravenoso com 5 ng de p24 NL4-3 (n = 8). A Figura 9C mostra a detecção de HIV p24 através de pigmentação imunohistoquímica de seções tomadas a partir de baços 8 semanas depois do desafio. AS setas indicam células marcadas como positivas para a expressão de p24. Barra de escala, 40 mm. A Figura 9D mostra a quantificação de pigmentação imunohistoquímica de baço denotando a frequência relativa de células expressando p24 em baços de animais infectados. ND, não detectado. Os asteriscos indicam resultados significantemente diferentes a partir de camundongos controle luciferase versus camundongos expressando anticorpos através do teste t bilateral (n = 4-6) **P,0,01, ***P,0,0001. As Figs. 9A-B mostram média e s.e.m.; A Fig. 9D mostra média e s.d.

[0050]A Figura 10 mostra as concentrações soro de IgG humana total e IgG de ligação a gp120 antes do desafio com HIV. A Figura 10A é um gráfico que mostra concentração de anticorpo humano total produzido por células enxertadas e VIP, conforme medido por ELISA de IgG humana em amostras de soro tomadas 5 semanas depois da injeção intramuscular de vetores expressando luciferase ou anticorpo b12 e 3 semanas depois da transferência adotada de PBMCs humanas e o dia antes do desafio IV com HIV (n = 8). A Figura 10B é um gráfico que mostra a concentração do anticorpo no mesmo ponto de tempo quantificado usando um ELISA específico de gp120 para medir a concentração do anticorpo específico para HIV (n = 8).

[0051]A Figura 11 são gráficos que mostram proteção de células CD4 mediada pelo anticorpo b12 com o passar do tempo. Depleção de células CD4 em camundongos humanizados huPBMC-NSG como um resultado do desafio intravenoso com a dose de NL4-3 indicada na extrema direita. Camundongos expressando luciferase (gráficos esquerdos) foram suscetíveis à perda de células CD4, ao passo que aqueles expressando b12 (gráficos direitos) demonstraram proteção de HIV em todas as doses (n = 8).

[0052]A Figura 12A é um gráfico que mostra a expressão de b12 com o passar do tempo como uma função de dose, conforme determinado por ELISA de IgG humana total em amostras de soro tomadas após a administração de AAV (n = 8). Camundongos que receberam vetor de expressão de luciferase não exibiram anticorpos humanos detectáveis (n = 12). A Figura 12B é um gráfico que mostra a concentração de b12 no soro um dia antes do desafio, 3 semanas depois da transferência adotada de PBMCs humanas e 15 semanas depois da administração intramuscular da dose indicada de AAV, conforme determinado por um ELISA específico de gp120 para medir a fração de anticorpos capazes de ligar HIV (n = 8 a 12). A Figura 12C é um gráfico que mostra a depleção de células CD4 em camundongos humanizados HuPBMC-NSG como um resultado do desafio intravenoso com 10 ng de NL4-3 em animais que expressam uma faixa de b12 demonstrando a dose mínima de anticorpo necessária para proteger contra infecção. As Figs. 12A e 12C mostram média e erro padrão, e a Fig. 12B mostra animais individuais e média (n = 8 - 12).

[0053]A Figura 13A é um gráfico que mostra a expressão de VRC01 com o passar do tempo como uma função de dose, conforme determinado por ELISA de IgG humana total em amostras de soro tomadas depois da administração de AAV (n = 8). Camundongos que receberam vetor de expressão de luciferase não exibiram anticorpos humanos detectáveis (n = 12). A Figura 13B é um gráfico que mostra a

concentração de VRC01 no soro 1 dia antes do desafio, 3 semanas depois da transferência adotada de PBMCs humanas e 15 semanas depois da administração intramuscular da dose indicada de AAV, conforme determinado por um ELISA específico de gp120 para medir a fração de anticorpos capazes de ligar a HIV (n = 8 - 12). A Figura 13C é um gráfico que mostra a depleção de células CD4 em camundongos humanizados huPBMC-NSG como um resultado do desafio intravenoso com 10 ng de NL4-3 em animais que expressam uma faixa de VRC01, demonstrando a dose mínima de anticorpo necessário para proteger contra infecção. As Figs. 13A e 13C mostram média e erro padrão, e a Fig. 13B mostra animais individuais e média (n = 8 - 12).

[0054]A Figura 14 é um gráfico que mostra a quantificação de IgG humana no soro através de ELISA, após a injeção intramuscular de 1×10^{11} cópias de genoma (GC) de vírus recombinantes AAV que expressam anticorpos não modificados b12, F10, ou CR6261 em camundongos Balb/C (o gráfico mostra média e erro padrão, n = 8).

[0055]A Figura 15 mostra a expressão aumentada de anticorpos F10 e CR6261 modificados. A Figura 15A é um gráfico de barras comparando o anticorpo b12 com F10 e sequências WT de CR6261 em comparação aos constructos quiméricos consistindo de F10 ou cadeia pesada de CR6261 com cadeia leve de b12. A Figura 15B é uma tabela listando várias cadeias leves de anticorpo b12 e/ou 4E10 modificado usado no vetor de AAV. A Figura 15C é um gráfico de barras comparando o nível de expressão de variantes de cadeia leve de anticorpo F10 consistindo de sequências VL de F10 fundidas a sequências de cadeia leve de anticorpo b12 e/ou 4E10. A Figura 15D é um gráfico de barras comparando o nível de expressão de variantes de cadeia leve de anticorpo CR6261 consistindo de sequências VL de CR6261 fundidas a sequências de cadeia leve de anticorpo b12 e/ou 4E10.

[0056]A Figura 16A é um gráfico que mostra a quantificação de IgG humana

no soro através de ELISA após injeção intramuscular de 1×10^{11} GC do vetor de expressão otimizado produzindo anticorpos b12, F10, ou CR6261 em camundongos Balb/C (o gráfico mostra média e erro padrão, n = 6). A Figura 16B é um gráfico que mostra atividade neutralizante dos soros tomados a partir de camundongos dados os anticorpos b12, F10, ou CR6261 expressando VIP, conforme medido contra cinco cepas de influenza (PR/8, CA/09, SI/06, VN/04, JP/57) usando um ensaio com repórter de GFP. Os valores são calculados como a dobra de diluição do soro que resultou em 50 % de neutralização da infecção por influenza. A linha tracejada representa a diluição mais baixa testada (20 vezes) e valores abaixo desta linha são extrapolados a partir do ajuste de curva ou são plotados ao longo do eixo para representar nenhuma atividade de neutralização detectável.

[0057]A Figura 17A é um gráfico que mostra a concentração de IgG humana na circulação, conforme medido por ELISA de IgG humana total em amostras de soro tomadas 5 semanas depois da injeção intramuscular do vetor expressando b12, F10, ou CR6261 e dois dias antes do desafio viral. A Figura 17B é um gráfico que mostra perda de peso observada em camundongos Balb/C após o desafio intranasal com 1x104 PFU de influenza CA/09 em animais que receberam controle expressando VIP (b12) ou F10-IgG (n = 8). A Figura 17C é um gráfico que mostra a correlação de perda de peso 4 dias após o desafio com concentração de CA/09 e CR6261-IgG. d, Perda de peso observada em camundongos Balb/C após o desafio intranasal com 5x104 PFU de SI06 em animais que receberam controle expressando VIP (b12) ou F10-IgG (n = 8). A Figura 17D é um gráfico que mostra a taxa de sobrevivência em camundongos Balb/C expressando b12 e F10 após o desafio intranasal de PR/8. A Figura 17E é um gráfico que mostra perda de peso observada em camundongos Balb/C após o desafio intranasal com 1000 PFU de PR/8 em animais que receberam controle expressando VIP (b12) ou F10 (n = 8). As Figuras 17F-G são gráficos que mostram neutralização *in vitro* de cinco cepas de influenza (PR/8, CA/09, SI/06,

VN/04, JP/57), conforme detectado pelo ensaios com repórter de GFP usando soros tomados a partir de animais que receberam AAV recombinante expressando b12, F10 ou CR6261, após desafio de CA/09 (Fig. 17F) ou SI06 (Fig. 17G). Os valores são calculados como a dobra de diluição que resultou em 50 % de neutralização de infecção por influenza. A linha tracejada representa a diluição mais baixa testada (diluição 20 vezes) e os valores abaixo desta linha são extrapolados a partir do ajuste de curva ou são plotados ao longo do eixo para representar nenhuma atividade de neutralização detectável.

[0058]A Figura 18A é um gráfico que mostra a quantificação da expressão de luciferase por imagem de Xenogen de camundongos jovens (3 meses) ou velhos (12 meses) NOD/SCID/$\gamma c^{-/-(}$NSG), após injeção intramuscular de 1×10^{11} GC de vetor expressando luciferase (n = 8). A Figura 18B é um gráfico que mostra a quantificação de IgG humana através de ELISA no soro de camundongos NSG jovens (3 meses) ou velhos (12 meses), após injeção intramuscular de 1×10^{11} GC de vetor expressando F10-IgG (n = 8). A Figura 18C são gráficos que mostram sobrevivência (esquerda) e perda de peso (direita) de camundongos NSG velhos com 3 meses que receberam AAV recombinante expressando luciferase ou F10-IgG, após o desafio intranasal com 1000 PFU de influenza PR/8 (n = 6 - 8). A Figura 18D são gráficos que mostram a sobrevivência (esquerda) e perda de peso (direita) de camundongos NSG velhos com 12 meses que receberam AAV recombinante expressando luciferase ou F10-IgG, após o desafio intranasal com 1000 PFU de influenza PR/8 (n = 4 - 6). A Figura 18E mostra a pigmentação com hematoxilina e eosina de seções de pulmão representativas tomadas a partir de camundongos NSG velhos com 3 meses que receberam luciferase ou F10-IgG expressando VIP 5 dias após o desafio com 1000 PFU de influenza PR/8 (barra de escala = 100 mícrons). A Figura 18F é um gráfico que mostra o escore ordinal denotando a inflamação, conforme quantificado por um patologista treinado (0 = nenhuma inflamação, 5 = inflamação máxima). A Figura 18G

é um gráfico que mostra a quantificação de RNA de influenza nos tecidos do pulmão como uma função de tempo, conforme os animais foram sacrificados para análise.

[0059]A Figura 19A é uma representação esquemática do regime de desafio com HIV mucosal de baixa dose utilizado no Exemplo 12. A cada semana, os camundongos foram sangrados e depois desafiados com p24 50 ng de JR-CSF através de administração intravaginal não abrasiva de inóculo, conforme indicado pelas setas cheias. A Figura 19B é um gráfico que mostra a depleção de células CD4 na circulação com o passar do tempo como um resultado de infecção por HIV, conforme medido por citometria de fluxo. A Figura 19C é um gráfico que mostra carga viral no plasma de HIV no momento do sacrifício, após os 13 desafios intravaginais, conforme medido pelo ensaio Abbott RealTime HIV-1 Viral Load qPCR. O limite de detecção para este ensaio foi de 200 cópias/mL. Amostras não detectadas foram plotadas no limite de detecção.

[0060]A Figura 20 é um gráfico que mostra a quantificação de IgG humana no soro através de ELISA, após a administração de vírus recombinantes AAV expressando anticorpos B12, AR3A e AR3B.

Descrição Detalhada

[0061]Na descrição detalhada seguinte, a referência será feita aos desenhos anexos, que formam uma parte deste relatório. As modalidades ilustrativas descritas na descrição detalhada, desenhos, e reivindicações não são limitantes. Outras modalidades podem ser utilizadas, e outras mudanças podem ser feitas, sem divergir do espírito ou escopo da matéria objeto apresentada neste relatório. Será facilmente entendido que os aspectos da presente divulgação, conforme geralmente descritos neste relatório, e ilustrados nas Figuras, podem ser arranjados, substituídos, combinados, e projetados em uma ampla variedade de configurações diferentes, todas as quais são explicitamente consideradas e fazem parte desta divulgação.

[0062]O presente pedido fornece vetores virais úteis na produção de vírus

adeno-associados recombinantes (AAVs), e AAVs recombinantes capazes de expressar uma ou mais proteínas de interesse em um meio apropriado, por exemplo, em uma célula, um tecido, um órgão, ou um paciente transfectado com os AAVs recombinantes. Também divulgados neste relatório são os métodos para fabricar e usar os AAVs recombinantes. Por exemplo, os AAVs recombinantes podem ser usados para produzir uma proteína de interesse *in vivo*, *ex vivo,* ou *in vitro*. Em algumas modalidades, a expressão da proteína de interesse pode ser usada para diagnosticar, prevenir, ou tratar uma ou mais doenças ou transtornos, tais como para reduzir ou inibir o risco de infecções virais.

[0063]Em algumas modalidades, o vetor viral compreende uma repetição terminal invertida 5' (ITR) de AAV e uma ITR de AAV 3', um promotor, um sítio de restrição a jusante do promotor para permitir a inserção de um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse, e um elemento regulador pós-transcricional a jusante do sítio de restrição, onde o promotor, o sítio de restrição e o elemento regulador pós-transcrição estão localizados a jusante da ITR de AAV 5' e a montante da ITR de AAV 3'. O vetor viral pode ser usado, por exemplo, para expressar uma ou mais proteínas de interesse (por exemplo, anticorpos). Por exemplo, o vetor viral pode incluir um polinucleotídeo que codifica uma ou mais anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV, anticorpos anti-influenza, ou combinações dos mesmos. O vetor viral pode, por exemplo, ser usado para produzir alto nível da(s) proteína(s) de interesse (por exemplo, anticorpos) em um paciente para propósitos diagnósticos ou terapêuticos.

Definições

[0064]A menos que de outro modo definido, termos técnicos e científicos usados neste relatório têm o mesmo significado, conforme comumente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica a qual esta invenção pertence. Veja, por exemplo, Singleton *et al*., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J.

Wiley & Sons (Nova Iorque, N.Y. 1994); Sambrook *et al*., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989). Para os propósitos da presente invenção, os termos seguintes são definidos abaixo.

[0065]Conforme usado neste relatório, o termo “vetor” se refere a um constructo de polinucleotídeo, tipicamente um plasmídeo ou um vírus, usado para transmitir material genético a uma célula hospedeira. Os vetores podem ser, por exemplo, vírus, plasmídeos, cosmídeos, ou fago. Um vetor, conforme usado neste relatório, pode ser composto de DNA ou RNA. Em algumas modalidades, um vetor é composto de DNA. Um “vetor de expressão” é um vetor que é capaz de direcionar a expressão de uma proteína codificada por um ou mais genes carregados pelo vetor quando ele está presente no meio apropriado. Os vetores são preferivelmente capazes de replicação autônoma. Tipicamente, um vetor de expressão compreende um promotor de transcrição, um gene, e um terminador de transcrição. A expressão de genes é usualmente colocada sob o controle de um promotor, e um gene é “ligado de maneira operável ao” promotor.

[0066]Conforme usado neste relatório, o termo “ligado de maneira operável” é usado para descrever a conexão entre os elementos reguladores e um gene ou sua região codificante. Tipicamente, a expressão de genes é colocada sob o controle de um ou mais elementos reguladores, por exemplo, sem limitação, promotores constitutivos ou induzíveis, elementos reguladores específicos do tecido, e acentuadores. Um gene ou região codificante é “ligado de maneira operável a” ou “operativamente ligado a” ou “associado de maneira operável com” os elementos reguladores, significando que o gene ou região codificante é controlado ou influenciado pelo elemento regulador. Por exemplo, um promotor é ligado de maneira operável a uma sequência codificante se o promotor efetuar a transcrição ou expressão da sequência codificante.

[0067]O termo “constructo,” conforme usado neste relatório, se refere a um

ácido nucleico recombinante que foi gerado para o propósito da expressão de uma sequência de nucleotídeos específica, ou que deve ser usado na construção de outras sequências de nucleotídeos recombinantes.

[0068]Conforme usado neste relatório, os termos “ácido nucleico” e “polinucleotídeo” são permutáveis e se referem a qualquer ácido nucleico, se composto de fosfodiéster ligações ou ligações modificadas, tais como fosfotriéster, fosforamidato, siloxano, carbonato, carboximetiléster, acetamidato, carbamato, tioéter, fosforamidato ligado em ponte, fosfonato de metileno ligado em ponte, fosforamidato ligado em ponte, fosforamidato ligado em ponte, fosfonato de metileno ligado em ponte, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoditioato, fosforotioato ligado em ponte ou ligações sultona, e combinações de tais ligações. Os termos “ácido nucleico” e “polinucleotídeo” também incluem especificamente ácidos nucleicos compostos de bases, exceto as cinco bases de ocorrência biológica (adenina, guanina, timina, citosina e uracil).

[0069]O termo “elemento regulador” e “elemento de controle de expressão” são usados permutavelmente e se referem a moléculas ácido nucleico que podem influenciar a expressão de uma sequência codificante ligado de maneira operável em um organismo hospedeiro particular. Estes termos são amplamente usados para e cobrem todos os elementos que promovem ou regulam a transcrição, incluindo promotores, elementos de núcleo exigidos para a interação básica de RNA polimerase e fatores de transcrição, elementos a montante, acentuadores, e elementos de resposta (veja, por exemplo, Lewin, “Genes V” (Oxford University Press, Oxford) páginas 847 - 873). Elementos reguladores exemplares em procariontes incluem promotores, sequências operadoras e um sítios de ligação de ribossomo. Elementos reguladores que são usados em células eucarióticas podem incluir, sem limitação, sequências controle transcricionais e de tradução, tais como promotores, acentuadores, sinais de *splicing*, sinais de poliadenilação, terminadores, sinais de

degradação de proteína, elemento interno de entrada de ribossomo (IRES), sequências 2A, e semelhantes, que fornecem e/ou regulam a expressão de uma sequência codificante e/ou produção de um polipeptídeo codificado em uma célula hospedeira.

[0070]Conforme usado neste relatório, sequências ou elementos 2A se referem a pequenos peptídeos introduzidos como um ligador entre duas proteínas, permitindo autoprocessamento intraribossomal autônomo de poliproteínas (Veja, por exemplo, de Felipe. Genetic Vaccines e Ther. 2:13 (2004); deFelipe *et al*. Traffic 5:616 - 626 (2004)). Estes peptídeos curtos permitem a coexpressão de múltiplas proteínas a partir de um vetor único. Muitos elementos 2A são conhecidos na técnica. Exemplos de sequências 2A que podem ser usadas nos métodos e sistema divulgados neste relatório, sem limitação, incluem sequências 2A a partir do vírus da febre aftosa (F2A), vírus da rinite A de equino (E2A), vírus *Thosea asigna* (T2A), e tescovírus-1 de suíno (P2A), conforme descrito na Publicação de Patente U.S. Nº 20070116690.

[0071]Conforme usado neste relatório, o termo “promotor” é uma sequência de nucleotídeos que permite a ligação de RNA polimerase e direciona a transcrição de um gene. Tipicamente, um promotor está localizado na região não codificante 5’ de um gene, próximo ao sítio de início transcricional do gene. Elementos de sequência dentro dos promotores que funcionam na iniciação da transcrição são frequentemente caracterizados por sequências de nucleotídeos consenso. Exemplos de promotores incluem, mas não são limitadas a, promotores a partir de bactérias, levedura, plantas, vírus, e mamíferos (incluindo seres humanos). Um promotor pode ser induzível, reprimível, e/ou constitutivo. Promotores induzíveis iniciam níveis aumentados de transcrição a partir do DNA sob seu controle em resposta a alguma mudança nas condições de cultura, tais como uma mudança na temperatura.

[0072]Conforme usado neste relatório, o termo “acentuador” se refere a um tipo de elemento regulador que pode aumentar a eficácia de transcrição, não obstante

a distância ou orientação do acentuador em relação ao sítio de início de transcrição.

[0073]Conforme usado neste relatório, o termo “anticorpo” é usado no sentido mais amplo e especificamente cobre anticorpos monoclonais humanos, não humanos (por exemplo, murinos) e humanizados (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos bispecíficos), e fragmentos de anticorpos contanto que eles exibam a atividade biológica desejada. Vários anticorpos podem ser expressos usando o sistema e método divulgados neste relatório. “Anticorpos” e “imunoglobulinas” são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto. O número de ligações dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de isotipos de imunoglobulina diferentes. Cada cadeia pesada compreende um domínio variável (V_H), seguido por vários domínios constantes. Cada cadeia leve compreende um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante em sua outra extremidade. O domínio constante da cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Embora os anticorpos exibam a especificidade de ligação a um antígeno específico, imunoglobulinas incluem anticorpos e outras moléculas do tipo anticorpo que carecem de especificidade de antígeno. Os polipeptídeos do último tipo são, por exemplo, produzidos em baixos níveis pelo sistema linfático e em níveis aumentados por mielomas.

[0074]Conforme usado neste relatório, o termo “variante” se refere a um polinucleotídeo (ou polipeptídeo) tendo uma sequência substancialmente similar a um polinucleotídeo de referência (ou polipeptídeo). No caso de um polinucleotídeo, uma variante pode ter deleções, substituições, adições de um ou mais nucleotídeos na extremidade 5’, extremidade 3’, e/ou um ou mais sítios internos em comparação ao polinucleotídeo de referência. Similaridades e/ou diferenças nas sequências entre

uma variante e o polinucleotídeo de referência podem ser detectadas usando técnicas convencionais conhecidas no ramo, por exemplo, reação em cadeia da polimerase (PCR) e técnicas de hibridização. Polinucleotídeos variantes também incluem polinucleotídeos sinteticamente derivados, tais como aqueles gerados, por exemplo, usando mutagênese sítio-dirigida. Em geral, uma variante de um polinucleotídeo, incluindo, mas não limitada a, um DNA, pode ter pelo menos cerca de 50%, cerca de 55%, cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou mais de identidade de sequência ao polinucleotídeo de referência, conforme determinado por programas de alinhamento de sequência conhecidos por técnicos habilitados. No caso de um polipeptídeo, uma variante pode ter deleções, substituições, adições de um ou mais aminoácidos em comparação ao polipeptídeo de referência. Similaridades e/ou diferenças nas sequências entre uma variante e o polipeptídeo de referência podem ser detectadas usando técnicas convencionais conhecidas no ramo, por exemplo, Western blot. Em geral, uma variante de um polipeptídeo, pode ter pelo menos cerca de 60%, cerca de 65%, cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99% ou mais de identidade de sequência ao polipeptídeo de referência, conforme determinado por programas de alinhamento de sequência conhecidos por técnicos habilitados.

[0075]Conforme usado neste relatório, o termo “transfecção” se refere à introdução de um ácido nucleico em uma célula hospedeira, tal como através do contato da célula com um vírus AAV recombinante, conforme descrito abaixo.

[0076]Conforme usado neste relatório, o termo “transgene” se refere a qualquer nucleotídeo ou sequência de DNA que é integrado em um ou mais cromossomos de uma célula alvo através da intervenção humana. Em algumas

modalidades, o transgene compreende um polinucleotídeo que codifica uma proteína de interesse. O polinucleotídeo que codifica a proteína é, em geral, ligado de maneira operável a outras sequências que são úteis para obter a expressão desejada do gene de interesse, tal como sequências reguladoras transcricionais. Em algumas modalidades, o transgene pode compreender adicionalmente um ácido nucleico ou outra(s) molécula(s) que é(são) usadas para marcar o cromossomo onde ele foi integrado.

[0077]Conforme usado neste relatório, “tratamento” se refere a uma intervenção clínica feita em resposta a uma doença, transtorno ou condição fisiológica manifestada por um paciente ou a qual um paciente pode estar suscetível. O objetivo do tratamento inclui, mas não é limitado ao alívio ou prevenção de sintomas, reduzindo ou parando a progressão ou piora de uma doença, transtorno, ou condição e/ou a remissão da doença, transtorno ou condição. “Tratamentos” se referem a tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas. Pacientes em necessidade de tratamento incluem aqueles já afetados por uma doença ou transtorno ou condição fisiológica indesejada, assim como aqueles em que a doença ou transtorno ou condição fisiológica indesejada deve ser prevenida.

[0078]Conforme usado neste relatório, o termo “quantidade eficaz” se refere a uma quantidade suficiente para efetuar resultados benéficos ou biológicos e/ou clínicos desejáveis.

[0079]Conforme usado neste relatório, um “paciente” se refere a um animal que é o objeto do tratamento, observação ou experimento. “Animal” inclui vertebrados de sangue quente e frio e invertebrados, tais como peixe, molusco, répteis, e, em particular, mamíferos. “Mamífero,” conforme usado neste relatório, se refere a um indivíduo pertencente à classe Mammalia e inclui, mas não é limitado a, seres humanos, animais domésticos e de criação, animais de zoológico, esportes e animais de estimação. Exemplos não limitantes de mamíferos incluem camundongos; ratos;

coelhos; porquinhos da índia; cães; gatos; ovelha; cabras; vacas; cavalos; primatas, tais como macacos, chimpanzés e gorilas, e, em particular, seres humanos. Em algumas modalidades, o mamífero é um ser humano. Entretanto, em algumas modalidades, o mamífero não é um ser humano.

Vetor de vírus adeno-associado (AAV)

[0080]O vírus adeno-associado (AAV) é um parvovírus deficiente de replicação, o genoma de DNA de fita única do qual apresenta cerca de 4,7 kb em comprimento, incluindo 145 repetições terminais invertidas de nucleotídeo (ITRs). As ITRs desempenham um papel na integração do DNA de AAV no genoma da célula hospedeira. Quando o AAV infecta uma célula hospedeira, o genoma viral é integrado no cromossomo do hospedeiro resultando em infecção latente da célula. Em um sistema natural, um vírus auxiliar (por exemplo, adenovírus ou herpesvírus) fornece genes que levam em consideração a produção de vírus AAV na célula infectada. No caso de adenovírus, os genes E1A, E1B, E2A, E4 e VA fornecem funções auxiliares. Após a infecção com um vírus auxiliar, o provírus AAV é resgatado e amplificado, e AAV e adenovírus são produzidos. Nos exemplos de vetores de AAV recombinante não tendo genes Rep e/ou Cap, o AAV pode ser não integrante.

[0081]Vetores de AAV que compreendem regiões codificantes de uma ou mais proteínas de interesse, por exemplo, proteínas que apresentam mais do que 500 aminoácidos em comprimento, são fornecidos. O vetor de AAV pode incluir uma repetição terminal invertida 5’ (ITR) de AAV, uma ITR de AAV 3’, um promotor, e um sítio de restrição a jusante do promotor para permitir a inserção de um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse, em que o promotor e o sítio de restrição estão localizados a jusante da ITR de AAV 5’ e a montante da ITR de AAV 3’. Em algumas modalidades, o vetor de AAV recombinante inclui um elemento regulador pós-transcricional a jusante do sítio de restrição e a montante da ITR de AAV 3’. Em algumas modalidades, os vetores de AAV divulgados neste relatório

podem ser usados como vetores de transferência de AAV portadores de um transgene que codifica uma proteína de interesse para produzir vírus recombinantes AAV que podem expressar a proteína de interesse em uma célula hospedeira.

[0082]A geração do vetor viral pode ser realizada usando quaisquer técnicas de engenharia genética adequadas bem conhecidas no ramo, incluindo, sem limitação, as técnicas padrão de digestão de endonuclease de restrição, ligação, transformação, purificação de plasmídeo, e sequenciamento de DNA, por exemplo, conforme descrito em Sambrook *et al*. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)).

[0083]O vetor viral pode incorporar sequências a partir do genoma de qualquer organismo conhecido. As sequências podem ser incorporadas em sua forma nativa ou podem ser modificadas em qualquer maneira para obter uma atividade desejada. Por exemplo, as sequências podem compreender inserções, deleções ou substituições.

Promotor

[0084]Vários promotores podem ser ligados de maneira operável com um ácido nucleico compreendendo a região codificante da proteína de interesse no vetor viral divulgado neste relatório. Em algumas modalidades, o promotor pode direcionar a expressão da proteína de interesse em uma célula infectada com um vírus derivado do vetor viral, tal como uma célula alvo. O promotor pode ser de ocorrência natural ou não natural.

[0085]Exemplos de promotores incluem, mas não são limitadas a, promotores virais, promotores de planta e promotores de mamífero. Exemplos de promotores virais incluem, mas não são limitadas a promotor precoce imediato de citomegalovírus (CMV), promotor de CAG (que é uma combinação do elemento acentuador precoce de CMV e promotor de beta-actina de galinha, descrito em Alexopoulou *et al.* BMC Cell Biology 9:2, (2008)), promotor de vírus 40 de símio (SV40), os promotores de

RNA 35S e RNA 19S de vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) descrito em Brisson *et al.*, Nature 1984, 310:511 - 514, que reveste o promotor de proteína ao vírus do mosaico de tabaco (TMV), e quaisquer variantes dos mesmos. Exemplos de promotores de planta incluem, mas não são limitados a, promotores de choque de calor, tais como hsp17.5-E ou hsp17.3-B de soja descrito em Gurley *et al.*, Mol. Cell. Biol. 1986, 6:559 - 565, e quaisquer variantes dos mesmos. Exemplos de promotores de mamífero incluem, mas não são limitados a, promotor da 1α-subunidade do fator de elongação humano (EF1-1α), promotor de ubiquitina C humana (UCB), promotor de fosfoglicerato cinase-1 de murino (PGK), e quaisquer variantes dos mesmos.

[0086]Em algumas modalidades, o promotor é um promotor sintético compreendendo pelo menos uma porção do promotor de CAG. A porção do promotor de CAG pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 3.

[0087]Em algumas modalidades, o promotor compreende um acentuador de CMV. Em algumas modalidades, o promotor compreende um acentuador de UBC. Em algumas modalidades, o promotor compreende pelo menos uma porção do acentuador de CMV. Por exemplo, o acentuador de CMV pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 2. Em algumas modalidades, o promotor compreende pelo menos uma porção do acentuador de UCB. O acentuador de UCB pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 4.

[0088]Em algumas modalidades, o promotor é um promotor sintético de CASI tendo uma sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1. O promotor sintético de CASI contém uma porção do acentuador de CMV, uma porção do promotor de beta-actina de galinha, e uma porção do acentuador de UBC. Em algumas modalidades, o promotor pode incluir uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o promotor compreende uma sequência de ácidos nucleicos que apresenta pelo menos cerca de 90% de identidade à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o promotor compreende uma sequência de ácidos nucleicos que apresenta pelo menos cerca de 95% de identidade à SEQ ID NO: 1. Em algumas modalidades, o promotor compreende uma sequência de ácidos nucleicos da SEQ ID NO: 1.

[0089]Em algumas modalidades, o vetor pode incluir um ou mais íntrons para facilitar o processamento do transcrito de RNA em células hospedeiras do mamífero. Um exemplo não limitante de tal íntron é o íntron de β-globina de coelho. Em algumas modalidades, o íntron é um íntron sintético. Por exemplo, o íntron sintético pode incluir uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 8. A localização do íntron no vetor pode variar. Em algumas modalidades, o íntron está localizado entre o promotor e o sítio de restrição. Em algumas modalidades, o íntron está localizado dentro do promotor. Em algumas modalidades, o íntron inclui um acentuador de UCB. O acentuador de UCB pode compreender uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 4.

[0090]Em algumas modalidades, o promotor é ligado de maneira operável com um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse. Em algumas modalidades, o promotor é ligado de maneira operável com um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada e/ou a cadeia leve de um anticorpo de interesse (tal como a região variável pesada e leve do anticorpo). Em algumas modalidades, o promotor é ligado de maneira operável com um polinucleotídeo que codifica a cadeia pesada e a cadeia leve de um anticorpo de interesse para permitir expressão multicistrônica dos genes de cadeia pesada e leve. Em algumas modalidades, uma sequência 2A ou elemento IRES está localizada entre a região codificante da região variável de cadeia pesada e da região codificante da região variável de cadeia leve no vetor para facilitar expressão equivalente de cada subunidade. Alternativamente, polinucleotídeos que codificam as cadeias pesadas e leves podem ser introduzidos separadamente na célula alvo, em um vetor viral apropriado.

[0091]O tamanho do promotor pode variar. Por causa da capacidade de empacotamento limitada de AAV, é preferido usar um promotor que é pequeno em tamanho, mas ao mesmo tempo permite produção de alto nível da(s) proteína(s) de interesse em células hospedeiras. Por exemplo, em algumas modalidades, o promotor apresenta no máximo cerca de 1,5 kb, no máximo cerca de 1,4 kb, no máximo cerca de 1,35 kb, no máximo cerca de 1,3 kb, no máximo cerca de 1,25 kb, no máximo cerca de 1,2 kb, no máximo cerca de 1,15 kb, no máximo cerca de 1,1 kb, no máximo cerca de 1,05 kb, no máximo cerca de 1 kb, no máximo cerca de 800 pares de base, no máximo cerca de 600 pares de base, no máximo cerca de 400 pares de base, no máximo cerca de 200 pares de base, ou no máximo cerca de 100 pares de base.

[0092]A sequência de nucleotídeos do promotor também pode ser modificada para aperfeiçoar a eficácia de expressão. Por exemplo, o promotor pode incluir um ou mais doadores de *splice*, um ou mais aceitantes de *splice*, e/ou combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o promotor inclui um doador de *splice* e um

aceitante de *splice*. Em algumas modalidades, o promotor inclui um ou mais doadores de *splice*, e nenhum aceitante de *splice*. Em algumas modalidades, o promotor não inclui doador de *splice*, e um ou mais aceitantes de *splice*. Por exemplo, em algumas modalidades, o doador de *splice* pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 5. Em algumas modalidades, o aceitante de *splice* pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 6.

Elementos reguladores

[0093]Vários elementos reguladores pós-transcricionais podem ser usados nos vetores virais, por exemplo, para aumentar o nível de expressão da proteína de interesse em uma célula hospedeira. Em algumas modalidades, o elemento regulador pós-transcricional pode ser um elemento regulador pós-transcricional viral. Exemplos não limitantes de elemento regulador pós-transcricional viral incluem elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite de marmota (WPRE), elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite B (HBVPRE), elemento de transporte de RNA (RTE), e quaisquer variantes dos mesmos. O WPRE pode compreender uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 7. O RTE pode ser um elemento resposta rev (RRE), por exemplo, um RRE lentiviral. Um exemplo não limitante é elemento de resposta rev do vírus da imunodeficiência de bovino (RRE). Em algumas modalidades, o RTE é um elemento de transporte constitutivo (CTE). Exemplos de CTE incluem, mas não são limitados ao Vírus Mason-

Pfizer de Macaco CTE e Vírus da Leucemia Aviária CTE.

[0094]O vetor viral descrito neste relatório pode incluir um replicon procariótico (isto é, uma sequência de DNA tendo a capacidade para direcionar a replicação autônoma e manutenção da molécula de DNA recombinante extracromossomicamente em uma célula hospedeira procariótica), tal como uma célula hospedeira bacteriana, transformada com a mesma. Tais replicons são bem conhecidos na técnica. Além disso, vetores que incluem um replicon procariótico também podem incluir um gene cuja expressão confere um marcador detectável, tal como uma resistência ao fármaco. Genes de resistência ao fármaco bacterianos típicos são aqueles que conferem resistência à ampicilina ou tetraciclina.

[0095]Em algumas modalidades, o vetor de AAV pode incluir um gene para um marcador selecionável que é eficaz em uma célula eucariótica, tal como um marcador de seleção de resistência ao fármaco. Este gene de marcador selecionável pode codificar um fator necessário para a sobrevivência ou crescimento de células hospedeiras transformadas cultivadas em um meio de cultura seletivo. Células hospedeiras não transformadas com o vetor contendo o gene de seleção não sobreviverão no meio de cultura. Genes de seleção típicos codificam proteínas que conferem resistência aos antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, canamicina, gentamicina, Zeocina, ou tetraciclina, deficiências auxotróficas do complemento, ou nutrientes críticos de fornecimento mantidos a partir do meio.

[0096]Os vetores virais divulgados neste relatório podem incluir vários elementos reguladores, tais como uma região de iniciação de transcrição e/ou uma região de terminação transcricional. Exemplos da região de terminação de transcrição incluem, mas não são limitados a, sequências sinal de poliadenilação. Exemplos de sequências sinal de poliadenilação incluem, mas não são limitados a, hormônio de crescimento Bovino (BGH) poli(A), poli(A) tardia de SV40, poli(A) de beta-globina de

coelho (RBG), timidina cinase (TK) sequências de poli(A), e quaisquer variantes dos mesmos. Em algumas modalidades, a região de terminação transcricional está localizada a jusante do elemento regulador pós-transcricional. Em algumas modalidades, a região de terminação transcricional é uma sequência sinal de poliadenilação. Em algumas modalidades, a região de terminação transcricional é a sequência poli(A) tardia de SV40.

[0097]Os vetores virais divulgados neste relatório também podem incluir um ou mais nucleotídeos A imediatamente depois de um sítio de restrição a jusante do promotor, onde o sítio de restrição permite a inserção de um polinucleotídeo que codifica a(s) proteína(s) de interesse. Por exemplo, um ou mais nucleotídeos A estão localizados imediatamente depois do códon de parada TAA da proteína de interesse depois da inserção do polinucleotídeo que codifica a proteína de interesse no vetor. Em algumas modalidades, um nucleotídeo A, dois nucleotídeos A, três nucleotídeos A, ou mais estão localizados imediatamente depois do sítio de restrição. Em algumas modalidades, um nucleotídeo A, dois nucleotídeos A, três nucleotídeos A, ou mais estão localizados imediatamente depois do códon de parada TAA da proteína de interesse.

[0098]Em algumas modalidades, os vetores virais podem incluir sequências adicionais que tornam os vetores adequados para a replicação e integração em eucariontes. Em outras modalidades, os vetores virais divulgados neste relatório podem incluir um elemento de transporte que torna os vetores adequados para a replicação e integração em procariontes e eucariontes. Em algumas modalidades, os vetores virais podem incluir sequências de iniciação de transcrição e tradução adicionais, tais como promotores e acentuadores; e terminadores de transcrição e tradução adicionais, tais como sinais de poliadenilação.

[0099]Em algumas modalidades, os vetores virais podem incluir uma sequência reguladora que permite, por exemplo, a tradução de múltiplas proteínas a

partir de um mRNA único. Exemplos não limitantes de tais sequências reguladoras incluem sítio interno de entrada do ribossomo (IRES) e sequência de autoprocessamento 2A. Em algumas modalidades, a sequência 2A é um sítio de peptídeo 2A a partir do vírus da febre aftosa (sequência F2A). Em algumas modalidades, a sequência F2A tem um sítio de clivagem de furina padrão. Por exemplo, a sequência F2A tendo um sítio de clivagem de furina padrão pode incluir uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 9. Em algumas modalidades, a sequência F2A tem um sítio de clivagem de furina modificado. Por exemplo, a sequência F2A tendo um sítio de clivagem de furina modificado pode incluir uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 10.

[00100]Os vetores virais também podem, em algumas modalidades, ter um ou mais sítios de restrição localizado em proximidade à sequência de promotor para fornecer a inserção das sequências de ácidos nucleicos que codificam uma ou mais proteínas de interesse e outras proteínas.

Proteína de interesse

[00101]Conforme usado neste relatório, uma “proteína de interesse” pode ser qualquer proteína, incluindo proteínas de ocorrência natural e não natural. Em algumas modalidades, um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse pode ser inserido nos vetores virais divulgados neste relatório, em que o polinucleotídeo é ligado de maneira operável com o promotor. Em alguns exemplos, o promotor pode direcionar a expressão das proteínas de interesse em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula muscular humana).

[00102]Exemplos da proteína de interesse incluem, mas não são limitados a, luciferases; proteínas fluorescentes (por exemplo, GFP); hormônios de crescimento (GHs) e variantes dos mesmos; fatores de crescimento tipo insulina (IGFs) e variantes dos mesmos; fatores estimulantes da colônia de granulócitos (G-CSFs) e variantes dos mesmos; eritropoietina (EPO) e variantes dos mesmos; insulina, tal como proinsulina, preproinsulina, insulina, análogos de insulina, e semelhantes; anticorpos e variantes dos mesmos, tais como anticorpos híbridos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos monoclonais; fragmento de ligação com os antígenos de um anticorpo (fragmentos Fab), fragmentos variáveis de cadeia única de um anticorpo (fragmentos de scFV); distrofina e variantes dos mesmos; fatores de coagulação e variantes dos mesmos; regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) e variantes dos mesmos; e interferons e variantes dos mesmos.

[00103]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é uma proteína terapêutica ou variante da mesma. Exemplos não limitantes de proteínas terapêuticas incluem fatores sanguíneos, tais como β-globina, hemoglobina, ativador do plasminogênio tecidual, e fatores de coagulação; fatores estimulantes de colônia (CSF); interleucinas, tais como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, etc.; fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de células tronco (SCF), fator de crescimento do fibroblasto (FGF, tal como FGF básico e FGF ácido), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fatores de crescimento tipo insulina (IGFs), proteína morfogenética do osso (BMP), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator-9 de diferenciação de crescimento (GDF-9), fator de crescimento derivado de hepatoma (HDGF), miostatina (GDF-8), fator de crescimento nervoso (NGF), neurotrofinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), trombopoietina (TPO), fator de transformação do crescimento alfa (TGF-α), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β), e semelhantes; receptores solúveis, tais como receptores de TNF-α solúveis, receptores de VEGF solúveis, receptores de

interleucina solúveis (por exemplo, receptores de IL-1 solúveis e receptores do IL-1 tipo II solúveis), receptores de células T γ/δ solúveis, fragmentos de ligação ao ligante de um receptor solúvel, e semelhantes; enzimas, tais como α-glucosidase, imiglucarase, β-glucocerebrosidase, e alglucerase; ativadores de enzima, tais como ativador do plasminogênio tecidual; quimiocinas, tais como IP-10, monocina induzida por interferon-gama (Mig), Groα/IL-8, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, MCP-1, PF-4, e semelhantes; agentes angiogênicos, tais como fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs, por exemplo, VEGF121, VEGF165, VEGF-C, VEGF-2), fator beta de transformação do crescimento, fator de crescimento do fibroblasto básico, fator de crescimento derivado de glioma, angiogenina, angiogenina-2; e semelhantes; agentes anti-angiogênicos, tais como um receptor de VEGF solúvel; vacina de proteína; peptídeos neuroativos, tais como fator de crescimento nervoso (NGF), bradicinina, colecistocinina, gastina, secretina, oxitocina, hormônio liberador de gonadotropina, beta-endorfina, encefalina, substância P, somatostatina, prolactina, galanina, hormônio liberador de hormônio de crescimento, bombesina, dinorfina, warfarina, neurotensina, motilina, tirotropina, neuropeptídeo Y, hormônio luteinizante, calcitonina, insulina, glucagons, vasopressina, angiotensina II, hormônio liberador de tirotropina, peptídeo intestinal vasoativo, um peptídeo do sono, e semelhantes; agentes trombolíticos; peptídeo natriurético atrial; relaxina; proteína de ácido fibrilar glial; hormônio estimulante do folículo (FSH); antitripsina alfa-1 humana; fator inibitório da leucemia (LIF); fatores de transformação do crescimento (TGFs); fatores de tecido, hormônio luteinizante; fatores de ativação de macrófagos; fator de necrose tumoral (TNF); fator quimiotático do neutrófilo (NCF); fator de crescimento nervoso; inibidores do tecido de metaloproteinases; peptídeo intestinal vasoativo; angiogenina; angiotropina; fibrina; hirudina; antagonistas do receptor de IL-1; e semelhantes. Alguns outros exemplos não limitantes da proteína de interesse incluem fator neurotrófico ciiar (CNTF); fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); neurotrofinas

3 e 4/5 (NT-3 e 4/5); fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF); aminoácido decarboxilase aromática (AADC); proteínas de coagulação relacionadas à hemofilia, tais como Fator VIII, Fator IX, Fator X; distrofina ou nini-distrofina; ácido lipase lisossômica; fenilalanina hidroxilase (PAH); enzimas relacionadas à doença de armazenamento de glicogênio, tais como glicose-6-fosfatase, ácido maltase, enzima desramificadora de glicogênio, glicogênio fosforilase muscular, glicogênio fosforilase do fígado, fosfofructocinase muscular, fosforilase cinase (por exemplo, PHKA2), transportador de glicose (por exemplo, GLUT2), aldolase A, β-enolase, e glicogênio sintase; enzimas lisossômicas (por exemplo, beta-N-acetilhexosaminidase A); e quaisquer variantes dos mesmos.

[00104]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é um fragmento ativo de uma proteína, tal como qualquer uma entre as proteínas anteriormente mencionadas. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é uma proteína de fusão compreendendo algumas ou todas as duas ou mais proteínas. Em algumas modalidades, uma proteína de fusão pode compreender todas ou uma porção de qualquer uma entre as proteínas anteriormente mencionadas.

[00105]Em algumas modalidades, o vetor viral compreende um polinucleotídeo compreendendo regiões codificantes para duas ou mais proteínas de interesse. As duas ou mais proteínas de interesse podem ser as mesmas ou diferentes. Em algumas modalidades, as duas ou mais proteínas de interesse são polipeptídeos relacionados, por exemplo anticorpos neutralizantes para o mesmo vírus.

[00106]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é uma proteína multi-subunidade. Por exemplo, a proteína de interesse pode compreender duas ou mais subunidades, ou duas ou mais cadeias de polipeptídeo independentes. Em algumas modalidades, a proteína de interesse pode ser um anticorpo. Exemplos de anticorpos incluem, mas não são limitados a, anticorpos de vários isotipos (por

exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, e IgM); anticorpos monoclonais produzidos por quaisquer meios conhecidos àqueles habilitados na técnica, incluindo um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal; anticorpos humanizados; anticorpos quiméricos; anticorpos de cadeia única; fragmentos de anticorpos, tais como Fv, F(ab')2, Fab', Fab, Facb, scFv e semelhantes; contanto que o anticorpo é capaz de se ligar ao antígeno. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo de comprimento total. Em algumas modalidades, a proteína de interesse não é um imunoadesina.

[00107]Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo anti-Malária. Exemplos não limitantes de anti-Malária incluem anticorpo 2A10 anti-Malária e anticorpo 2C11 anti-Malária.

[00108]Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo neutralizante viral. Por exemplo, o anticorpo pode ser um anticorpo neutralizante para HIV, HCV ou vírus da influenza. Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo neutralizante anti-HIV. Em algumas modalidades, um anticorpo neutralizante anti-HIV pode ser, por exemplo, um anticorpo monoclonal neutralizante humano que neutraliza muitos isolados primários de subtipos genéticos diferentes de HIV-1.

[00109]Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo neutralizante anti-HCV.

[00110]Em algumas modalidades, o anticorpo é um anticorpo neutralizante anti-influenza. Exemplos não limitantes de anticorpos virais neutralizantes incluem anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, anticorpo VRC01 anti-HIV, anticorpo 3BNC60 anti-HIV, anticorpo 3BNC117 anti-HIV, anticorpo NIH45-46 anti-HIV, anticorpo NIH45-46W anti-HIV, anticorpo VRC-PG04 anti-HIV, anticorpo VRC-CH31 anti-HIV, anticorpo PGT121 anti-HIV, anticorpo PGT128 anti-HIV, anticorpo anti-influenza F10, anticorpo anti-influenza CR6261, anticorpo influenza TCN32, anticorpo anti-influenza FI6, anticorpo FI6v3 anti-

influenza, anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B, anticorpo anti-HCV AR4A, e quaisquer variantes dos mesmos.

[00111]Conforme descrito neste relatório, a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse pode ser modificada para aperfeiçoar a eficácia de expressão da proteína. Os métodos que podem ser usados para aperfeiçoar a transcrição e/ou tradução de um gene neste relatório não são particularmente limitados. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos pode ser modificada para melhor refletir a utilização do códon do hospedeiro para aumentar a expressão de genes (por exemplo, produção de proteína) no hospedeiro (por exemplo, um mamífero). Como um outro exemplo não limitante para a modificação, um ou mais entre os doadores de *splice* e/ou aceitantes de *splice* na sequência de nucleotídeos da proteína de interesse é modificado para reduzir o potencial quanto ao *splicing* estranho.

[00112]A proteína de interesse pode ser de vários comprimentos. Por exemplo, a proteína de interesse pode ser pelo menos cerca de 200 aminoácidos, pelo menos cerca de 250 aminoácidos, pelo menos cerca de 300 aminoácidos, pelo menos cerca de 350 aminoácidos, pelo menos cerca de 400 aminoácidos, pelo menos cerca de 450 aminoácidos, pelo menos cerca de 500 aminoácidos, pelo menos cerca de 550 aminoácidos, pelo menos cerca de 600 aminoácidos, pelo menos cerca de 650 aminoácidos, pelo menos cerca de 700 aminoácidos, pelo menos cerca de 750 aminoácidos, pelo menos cerca de 800 aminoácidos, ou mais em comprimento. Em algumas modalidades, a proteína de interesse apresenta pelo menos cerca de 480 aminoácidos em comprimento. Em algumas modalidades, a proteína de interesse apresenta pelo menos cerca de 500 aminoácidos em comprimento. Em algumas modalidades, a proteína de interesse apresenta cerca de 750 aminoácidos em comprimento.

[00113]Quando é desejado incluir regiões codificantes para duas ou mais proteínas de interesse, duas ou mais cadeias de polipeptídeos individuais, ou duas ou

mais subunidades de uma proteína de interesse em um vetor viral, cada região codificante adicional além da primeira é preferivelmente ligada a um elemento que facilita a coexpressão das proteínas em células hospedeiras, tais como um elemento interno de sequência de entrada de ribossomo (IRES) (Patente U.S. Nº 4.937.190), ou um elemento 2A. Por exemplo, elementos IRES ou 2A são preferivelmente usados quando um vetor único compreende sequências que codificam cada subunidade de uma proteína de multi-subunidade. No caso de que a proteína de interesse é imunoglobulina com uma especificidade desejada, por exemplo, a primeira região codificante (codificando na cadeia pesada ou leve de imunoglobulina) está localizada a jusante do promotor. A segunda região codificante (codificando a cadeia remanescente de imunoglobulina) pode estar localizada a jusante da primeira região codificante, e um elemento IRES ou 2A pode estar disposto entre as duas regiões codificantes, preferivelmente, imediatamente precedente à segunda região codificante. A incorporação de um elemento IRES ou 2A entre as sequências de um primeiro e segundo gene (codificando as cadeias pesadas e leves, respectivamente) pode permitir que as cadeias sejam expressas a partir do mesmo promotor a cerca do mesmo nível na célula.

[00114]Em algumas modalidades, a proteína de interesse compreende duas ou mais subunidades, por exemplo uma imunoglobulina (Ig). O vetor viral pode incluir uma região codificante para cada uma das subunidades. Por exemplo, o vetor viral pode incluir a região codificante para a cadeia pesada de Ig (ou a região variável da cadeia pesada de Ig) e a região codificante para a cadeia leve de Ig (ou a região variável da cadeia leve de Ig). Em algumas modalidades, os vetores incluem uma primeira região codificante para a região variável de cadeia pesada de um anticorpo, e uma segunda região codificante para a região variável de cadeia leve do anticorpo. As duas regiões codificantes podem ser separadas, por exemplo, por uma sequência de autoprocessamento 2A para permitir transcrição multi-cistrônica das duas regiões

codificantes.

[00115]O vetor viral pode incluir regiões codificantes para duas ou mais proteínas de interesse. Por exemplo, o vetor viral pode incluir a região codificante para uma primeira proteína de interesse e a região codificante para uma segunda proteína de interesse. A primeira proteína de interesse e a segunda proteína de interesse podem ser as mesmas ou diferentes. Em algumas modalidades, o vetor viral pode incluir as regiões codificantes para uma terceira ou uma quarta proteína de interesse. A terceira e a quarta proteínas de interesse podem ser as mesmas ou diferentes. O comprimento total das duas ou mais proteínas de interesse codificadas por um vetor viral pode variar. Por exemplo, o comprimento total das duas ou mais proteínas pode ser pelo menos cerca de 400 aminoácidos, pelo menos cerca de 450 aminoácidos, pelo menos cerca de 500 aminoácidos, pelo menos cerca de 550 aminoácidos, pelo menos cerca de 600 aminoácidos, pelo menos cerca de 650 aminoácidos, pelo menos cerca de 700 aminoácidos, pelo menos cerca de 750 aminoácidos, pelo menos cerca de 800 aminoácidos, ou mais.

[00116]A sequência consenso de Kozak, consenso de Kozak ou sequência de Kozak, é conhecida como uma sequência que ocorre no mRNA eucariótico e tem o (gcc)gccRccAUGG consenso, onde R é um purina (adenina ou guanina) três bases a montante do códon de partida (AUG), que é seguido por uma outra “G.” Em algumas modalidades, o vetor compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência, ou mais à sequência consenso de Kozak. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma sequência consenso de Kozak. Em algumas modalidades, o vetor inclui uma sequência consenso de Kozak depois que o polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse é inserido no vetor, por exemplo, no sítio de restrição a jusante do promotor. Por exemplo, o vetor pode incluir uma sequência de nucleotídeos de GCCGCCATG (SEQ ID NO: 41), onde o ATG é o códon de partida

da proteína de interesse. Em algumas modalidades, o vetor compreende uma sequência de nucleotídeos de GCGGCCGCCATG (SEQ ID NO: 42), onde o ATG é o códon de partida da proteína de interesse.

[00117]A proteína de interesse pode ser isolada e purificada, se desejado, de acordo com métodos convencionais conhecidos àqueles habilitados na técnica. Por exemplo, um lisato pode ser preparado das células hospedeiras de expressão e o lisato pode ser purificado usando HPLC, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de troca aniônica, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de exclusão por tamanho, ultrafiltração, eletroforese em gel, cromatografia de afinidade, e/ou outras técnicas de purificação.

Sequência de peptídeo sinal

[00118]Várias sequências de peptídeo sinal pode ser usadas no vetor viral divulgado neste relatório. A sequência de peptídeo sinal pode ser de ocorrência natural ou não natural.

[00119]Em algumas modalidades, um peptídeo sinal pode fornecer secreção a partir de uma célula de mamífero. Exemplos de peptídeos sinais incluem, mas não são limitadas ao peptídeo sinal endógeno para HGH e variantes dos mesmos; o peptídeo sinal endógeno para interferons e variantes dos mesmos, incluindo o peptídeo sinal do tipo I, II e III interferons e variantes dos mesmos; e os peptídeos sinais endógenos para citocinas conhecidas e variantes dos mesmos, tais como o peptídeo sinal de eritropoietina (EPO), insulina, TGF-β1, TNF, IL1-α, e IL1-β, e variantes dos mesmos. Em algumas modalidades, o peptídeo sinal é um peptídeo sinal de HGH modificado. Em algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99%, ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 11. Em algumas modalidades, a sequência

de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 12.

[00120]Em algumas modalidades, o polipeptídeo sinal para uma proteína que é diferente da proteína de interesse pode ser usado. Em algumas modalidades, o polipeptídeo sinal nativo para a proteína de interesse é usado. Em alguns exemplos, um peptídeo sinal de ocorrência não natural pode ser usado.

[00121]Tipicamente, a sequência de nucleotídeos do peptídeo sinal está localizada imediatamente a montante da região codificante da proteína de interesse (por exemplo, fundida na 5’ da região codificante da proteína de interesse) no vetor. Nos exemplos onde o vetor viral inclui as regiões codificantes de duas ou mais proteínas de interesse, a sequência de peptídeo sinal pode ser inserida imediatamente a montante de uma ou mais entre as regiões codificantes. Em algumas modalidades, cada uma das regiões codificantes tem uma sequência de peptídeo sinal fundida na extremidade 5’. A sequência de peptídeo sinal adicionada a cada região codificante pode ser a mesma ou diferente. Por exemplo, quando a proteína de interesse tem duas subunidades, o vetor viral pode incluir uma região codificante para uma entre as subunidades e uma região codificante para a outra subunidade, e uma sequência de peptídeo sinal pode ser inserida imediatamente a montante de qualquer uma entre as regiões codificantes, ou duas entre as regiões codificantes. Como um outro exemplo não limitante, o vetor viral pode incluir uma região codificante para a região variável de cadeia pesada de uma imunoglobulina e um região codificante para a região variável de cadeia leve da imunoglobulina, e cada uma entre as regiões codificantes é fundida com uma sequência de peptídeo sinal na extremidade 5’. Em algumas modalidades, as duas sequências de peptídeos sinais são as mesmo. Em algumas modalidades, as duas sequências de peptídeos sinais são diferentes.

[00122]Em algumas modalidades, após a expressão e/ou secreção da proteína, os peptídeos sinais podem ser clivados a partir das proteínas precursoras resultando em proteínas maduras.

[00123]Em algumas modalidades, a região no vetor viral partindo da ITR de AAV 5’ e terminando na ITR de AAV 3’ pode ser liberada a uma célula hospedeira e integrar no genoma da célula hospedeira. O comprimento desta região pode variar. Por exemplo, o comprimento desta região pode ser pelo menos cerca de 2kb, pelo menos cerca de 2,25 kb, pelo menos cerca de 2,5 kb, pelo menos cerca de 2,75 kb, pelo menos cerca de 3 kb, pelo menos cerca de 3,25 kb, pelo menos cerca de 3,5 kb, pelo menos cerca de 3,75 kb, pelo menos cerca de 4 kb, pelo menos cerca de 4,25 kb, ou pelo menos cerca de 4,5 kb. Em algumas modalidades, esta região apresenta pelo menos cerca de 2,5 kb. Em algumas modalidades, esta região apresenta cerca de 4,5 kb. Em algumas modalidades, o vetor viral não é um vetor de AAV autocomplementar (scAAV).

[00124]Conforme divulgado acima, os vetores virais podem incluir vários elementos, por exemplo, mas não limitados a, um promotor, um transgene que codifica a proteína de interesse, uma sequência de peptídeo sinal, um elemento regulador pós-transcricional, um elemento terminal transcricional, e uma sequência reguladora permitindo a tradução de múltiplas proteínas a partir de um mRNA único. Um técnico habilitado avaliará que um vetor viral pode incluir um entre estes elementos, ou quaisquer combinações de dois ou mais entre estes elementos. Por exemplo, o vetor viral pode incluir pelo menos um elemento ou uma combinação de elementos listados na Tabela 1. A convenção usada na Tabela 1 é como segue:

A = promotor

B = transgene

C = sequência de peptídeo sinal

D = elemento regulador pós-transcricional

E = elemento terminal transcricional

F = sequência reguladora que permite a tradução de múltiplo proteínas a partir de um mRNA único

G = sequência consenso de Kozak

Tabela 1. Elemento ou combinação de elementos incluídos em algumas modalidades do vetor viral

A	B	C	D	E
F	G	A+B	A+C	A+D
A+E	A+F	A+G	B+C	B+D
B+E	B+F	B+G	C+D	C+E
C+F	C+G	D+E	D+F	D+G
E+F	E+G	F+G	A+B+C	A+B+D
A+B+E	A+B+F	A+B+G	A+C+D	A+C+E
A+C+F	A+C+G	A+D+E	A+D+F	A+D+G
A+E+F	A+E+G	A+F+G	B+C+D	B+C+E
B+C+F	B+C+G	B+D+E	B+D+F	B+D+G
B+E+F	B+E+G	C+D+E	C+D+F	C+D+G
C+E+F	C+E+G	C+F+G	D+E+F	D+E+G
E+F+G	A+B+C+D	A+B+C+E	A+B+C+F	A+B+C+G
A+B+D+E	A+B+D+F	A+B+D+G	A+B+E+F	A+B+E+G
A+B+F+G	A+C+D+E	A+C+D+F	A+C+D+G	A+C+E+F
A+C+E+G	A+C+F+G	A+D+E+F	A+D+E+G	A+D+F+G
A+E+F+G	B+C+D+E	B+C+D+F	B+C+D+G	B+C+E+F
B+C+E+G	B+C+F+G	B+D+E+F	B+D+E+G	B+D+F+G
B+E+F+G	C+D+E+F	C+D+E+G	C+D+F+G	C+E+F+G
D+E+F+G	A+B+C+D+E	A+B+C+D+F	A+B+C+D+G	A+B+C+E+F
A+B+C+E+G	A+B+C+F+G	A+B+D+E+F	A+B+D+E+G	A+B+D+F+G

A+B+E+F+G	A+C+D+E+F	A+C+D+E+G	A+C+D+F+G	A+C+E+F+G
A+D+E+F+G	B+C+D+E+F	B+C+D+E+G	B+C+D+F+G	B+C+E+F+G
B+D+E+F+G	C+D+E+F+G	A+B+C+D+E+F	A+B+C+D+E+G	A+B+C+D+F+G
A+B+C+E+F+G	A+B+D+E+F+G	A+C+D+E+F+G	B+C+D+E+F+G	A+B+C+D+E+F+G

[00125]Conforme descrito acima, a sequência de nucleotídeos de cada um entre os elementos listados acima pode ser modificada para aumentar a eficácia de expressão da proteína de interesse em uma célula hospedeira. Em algumas modalidades em que mais do que um transgene está presente no vetor viral, uma sequência que pode facilitar a coexpressão dos transgenes pode ser usada. Exemplos não limitantes de tal sequência incluem IRES, sequência 2A, e variantes dos mesmos.

[00126]Sequências de exemplos não limitantes dos vetores de AAV são fornecidas na SEQ ID NOs: 13 - 30. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor de CMV, sequências codificantes para o anticorpo anti-HIV b12 e sequência poli(A) tardia de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 13; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para a proteína de luciferase, WPRE, e sequência poli(A) tardia de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 14; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para a proteína de luciferase, WPRE, e sequência de poli(A) de beta-globina de coelho (RBG) é apresentada na SEQ ID NO: 15; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para a proteína de luciferase, WPRE, e sequência de poli(A) de hormônio de crescimento bovino (BGH) é apresentado na SEQ ID NO: 16; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo anti-HIV b12, WPRE, e sequência poli(A) de SV40 é

apresentada na SEQ ID NO: 17; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo 4E10AB anti-HIV, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 18; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo anti-HIV 2G12, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 19; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para anticorpo 2F5AB anti-HIV, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 20; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo anti-HIV b12, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 21; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo AR3, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 22; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo AR3, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 23; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo VRC01 anti-HIV, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 24; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo anti-influenza TCN32, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 25; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo CR6261, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 26; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo F10, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 27; a sequência de nucleotídeos para um

vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo AR4, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 28; a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo FI6, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 29; e a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor sintético CASI, sequências codificantes para o anticorpo FI6, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 30. Em algumas modalidades, as sequências codificantes do anticorpo são variantes da sequência codificante do tipo selvagem do anticorpo. Como um outro exemplo, a sequência de nucleotídeos para um vetor de AAV, incluindo o promotor de CASI, WPRE, e sequência de poli(A) de SV40 é apresentada na SEQ ID NO: 40. Um técnico habilitado avaliará que em cada um dos vetores virais descritos acima, a sequência de nucleotídeos que codifica o anticorpo pode ser substituída por qualquer outra sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína de interesse, tal como qualquer outra sequência de ácidos nucleicos que codifica um anticorpo, por exemplo, qualquer anticorpo anti-HIV, anti-HCV, e/ou anti-influenza conhecido.

[00127]Em algumas modalidades, o vetor de AAV compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NOs: 13 - 30. Em algumas modalidades, o vetor de AAV compreende uma sequência de nucleotídeos tendo pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, pelo menos cerca de 99% ou mais de identidade de sequência à SEQ ID NO: 40.

[00128]Em algumas modalidades, o vetor viral inclui o promotor de CMV e sequência poli(A) tardia de SV40. Em algumas modalidades, o vetor de AAV inclui o promotor sintético CASI, WPRE e sequência poli(A) tardia de SV40. Em algumas

modalidades, o vetor de AAV inclui o promotor sintético CASI, WPRE e sequência de poli(A) de beta-globina (RBG) de coelho. Em algumas modalidades, o vetor de AAV inclui o promotor sintético CASI, WPRE e sequência de poli(A) do hormônio de crescimento bovino (BGH). Em algumas modalidades, o vetor de AAV inclui. Em algumas modalidades, o vetor viral inclui o promotor de CAG e sequência poli(A) tardia de SV40. Em algumas modalidades, o vetor viral inclui o promotor de CAG, WPRE e sequência poli(A) tardia de SV40.

Método para produzir AAVs recombinantes

[00129]O presente pedido fornece métodos e materiais para produzir AAVs recombinantes que podem expressar uma ou mais proteínas de interesse em uma célula hospedeira. Conforme descrito neste relatório, os métodos e materiais divulgados neste relatório levam em consideração alta produção das proteínas de interesse, por exemplo, um anticorpo, tal como um anticorpo de comprimento total.

[00130]Em algumas modalidades, métodos para produzir um AAV recombinante incluem fornecer uma linhagem celular de empacotamento com um constructo viral compreendendo uma repetição terminal invertida 5’ (ITR) de AAV e uma ITR de AAV 3’, tal como descrito neste relatório, funções auxiliares para gerar uma infecção de AAV produtiva, e genes cap de AAV; e recuperar um AAV recombinante a partir do sobrenadante da linhagem celular de empacotamento. Vários tipos de células podem ser usados como a linhagem celular de empacotamento. Por exemplo, as linhagens celulares de empacotamento que podem ser usadas incluem, mas não são limitadas a, células HEK 293, células HeLa, e células Vero, por exemplo, conforme divulgado na Publicação de Patente U.S. Nº 20110201088.

[00131]Em algumas modalidades, o sobrenadante da linhagem celular de empacotamento é tratado por precipitação com PEG para concentrar o vírus. Em algumas modalidades, a precipitação ocorre em não mais do que cerca de 4 °C (por exemplo, cerca de 3 °C, cerca de 2 °C, cerca de 1 °C) durante pelo menos cerca de 2

horas, pelo menos cerca de 3 horas, pelo menos cerca de 4 horas, pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 9 horas, pelo menos cerca de 12 horas, ou pelo menos cerca de 24 horas. Em algumas modalidades, o AAV recombinante é isolado do sobrenadante precipitado com PEG através de centrifugação de baixa velocidade, seguido por gradiente de CsCl. A centrifugação de baixa velocidade pode ser a cerca de 4000 rpm, cerca de 4500 rpm, cerca de 5000 rpm, ou cerca de 6000 rpm durante cerca de 20 minutos, cerca de 30 minutos, cerca de 40 minutos, cerca de 50 minutos ou cerca de 60 minutos. Em algumas modalidades, o AAV recombinante é isolado do sobrenadante precipitado com PEG através de centrifugação a cerca de 5000 rpm durante cerca de 30 minutos, seguido por gradiente de CsCl.

[00132]Em algumas modalidades, o constructo viral compreende ainda um promotor e um sítio de restrição a jusante do promotor para permitir a inserção de um polinucleotídeo que codifica uma ou mais proteínas de interesse, em que o promotor e o sítio de restrição estão localizados a jusante da ITR de AAV 5’ e a montante da ITR de AAV 3’. Em algumas modalidades, o constructo viral compreende ainda um elemento regulador pós-transcricional a jusante do sítio de restrição e a montante da ITR de AAV 3’. Em algumas modalidades, o constructo viral compreende ainda um polinucleotídeo inserido no sítio de restrição e ligado de maneira operável com o promotor, onde o polinucleotídeo compreende a região codificante de uma proteína de interesse. Como um técnico habilitado avaliará, qualquer vetor de AAV divulgado no presente pedido pode ser usado no método como o constructo viral para produzir o AAV recombinante.

[00133]Em algumas modalidades, as funções auxiliares são fornecidas por um ou mais plasmídeos auxiliares ou vírus auxiliares compreendendo genes auxiliares adenovirais. Exemplos não limitantes dos genes auxiliares adenovirais incluem E1A, E1B, E2A, E4 e VA, que podem fornecer funções auxiliares ao empacotamento de AAV.

[00134]Em algumas modalidades, os genes cap de AAV estão presentes em um plasmídeo. O plasmídeo pode ainda compreendem um gene rep de AAV. É considerado pelo presente pedido que os genes cap e/ou gene rep a partir de qualquer sorotipo de AAV (incluindo, mas não limitado a, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, e quaisquer variantes dos mesmos) podem ser usados neste relatório para produzir o AAV recombinante divulgado neste relatório para expressar uma ou mais proteínas de interesse. Em algumas modalidades, os genes cap de AAV codificam um capsídeo a partir do sorotipo 1, sorotipo 2, sorotipo 4, sorotipo 5, sorotipo 6, sorotipo 7, sorotipo 8, sorotipo 9, ou uma variante dos mesmos.

[00135]Em algumas modalidades, a linhagem celular de empacotamento pode ser transfectada com o plasmídeo auxiliar ou vírus auxiliar, o constructo viral e o plasmídeo codificando os genes cap de AAV; e o vírus AAV recombinante pode ser coletado em vários pontos no tempo depois da cotransfecção. Por exemplo, o vírus AAV recombinante pode ser coletado a cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 36 horas, cerca de 48 horas, cerca de 72 horas, cerca de 96 horas, cerca de 120 horas, ou um tempo entre qualquer um entre estes dois pontos no tempo depois da cotransfecção.

[00136]Vírus auxiliares de AAV são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, vírus a partir da família Adenoviridae e da família Herpesviridae. Exemplos de vírus auxiliares de AAV incluem, mas não são limitados a, vírus auxiliar SAdV-13 e vírus auxiliar do tipo SAdV-13 descrito na Publicação U.S. Nº 20110201088, vetores auxiliares pHELP (Applied Viromics). Um técnico habilitado avaliará que qualquer vírus auxiliar ou plasmídeo auxiliar de AAV que pode fornecer função auxiliar adequada a AAV pode ser usada neste relatório.

[00137]Os vírus AAV recombinantes divulgados neste relatório também podem ser produzidos usando quaisquer métodos de convenção conhecidos na técnica adequados para produzir AAV recombinante infeccioso. Em alguns exemplos,

um AAV recombinante pode ser produzido usando uma linhagem celular que expressa de forma estável alguns dos componentes necessários para a produção de partícula de AAV. Por exemplo, um plasmídeo (ou múltiplos plasmídeos) compreendendo genes rep e cap de AAV, e um marcador selecionável, tal como um gene de resistência à neomicina, podem ser integrados no genoma de uma célula (as células de empacotamento). A linhagem celular de empacotamento depois pode ser coinfectada com um vírus auxiliar (por exemplo, adenovírus fornecendo as funções auxiliares) e o vetor viral compreendendo a ITR de AAV 5’ e 3’ e as sequências de nucleotídeos que codifica as proteínas de interesse. As vantagens deste método são que as células são selecionáveis e são adequadas para a produção de larga escala do AAV recombinante. Como um outro exemplo não limitante, adenovírus ou baculovírus ao invés de plasmídeos podem ser usados para introduzir genes rep e cap em células de empacotamento. Como um outro exemplo não limitante, o vetor viral contendo as ITRs de AAV 5’ e 3’ e os genes rep-cap podem ser estavelmente integrados no DNA de células produtoras, e as funções auxiliares podem ser fornecidas por um adenovírus do tipo selvagem para produzir o AAV recombinante.

[00138]Em algumas modalidades, o AAV recombinante não é um AAV autocomplementar (scAAV).

[00139]Conforme será avaliado com um técnico habilitado, quaisquer métodos convencionais adequados para purificar AAV podem ser usados nas modalidades descritas neste relatório para purificar o AAV recombinante. Por exemplo, o recombinante pode ser isolado e purificado a partir de células de empacotamento e/ou o sobrenadante das células de empacotamento. Em algumas modalidades, o AAV pode ser purificado por método de separação usando um gradiente de CsCl. Além disso, a Publicação de Patente U.S. Nº 20020136710 descreve um outro exemplo não limitante de método para purificar AAV, em que AAV foi isolado e purificado a partir de uma amostra usando um suporte sólido que inclui

uma matriz a qual um receptor artificial ou molécula do tipo receptor que medeia a ligação de AAV é imobilizado.

Aplicações dos vetores virais e AAV recombinante

[00140]Os vetores virais divulgados neste relatório podem ser usados para gerar AAV recombinante expressando a(s) proteína(s) de interesse. As proteínas produzidas pelo AAV recombinante gerado pelos métodos e sistemas descritos neste relatório têm uma ampla variedade de utilidades, por exemplo, elas podem ser úteis em aplicações, tais como diagnósticos, produtos terapêuticos, pesquisa, triagem de composto e descoberta de fármaco.

Produção de proteínas in vitro

[00141]Como um exemplo não limitante, o AAV recombinante divulgado neste relatório pode ser usado para produzir uma proteína de interesse *in vitro*, por exemplo, em uma cultura celular. Como um exemplo não limitante, em algumas modalidades, um método para produzir uma proteína de interesse *in vitro*, onde o método inclui fornecer um AAV recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse; e contatar o AAV recombinante com uma célula em uma cultura celular, por meio da qual AAV recombinante expressa a proteína de interesse na célula. O tamanho da sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse pode variar. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos pode ser pelo menos cerca de 1,4 kb, pelo menos cerca de 1,5 kb, pelo menos cerca de 1,6 kb, pelo menos cerca de 1,7 kb, pelo menos cerca de 1,8 kb, pelo menos cerca de 2,0 kb, pelo menos cerca de 2,2 kb, pelo menos cerca de 2,4 kb, pelo menos cerca de 2,6 kb, pelo menos cerca de 2,8 kb, pelo menos cerca de 3,0 kb, pelo menos cerca de 3,2 kb, pelo menos cerca de 3,4 kb, ou pelo menos cerca de 3,5 kb em comprimento. Em algumas modalidades, o nucleotídeo apresenta pelo menos cerca de 1,4 kb em comprimento.

[00142]Conforme divulgado acima, a proteína de interesse não é, de qualquer maneira, limitada. Por exemplo, a proteína de interesse pode ser um anticorpo, por

exemplo, um anticorpo neutralizante viral. O AAV recombinante divulgado neste relatório pode produzir altos níveis das proteínas de interesse *in vitro*.

[00143]Em algumas modalidades, a proteína de interesse é luciferase ou uma proteína fluorescente (por exemplo, GFP). O AAV recombinante que expressa a proteína fluorescente pode ser usado para marcar células com fluorescência permitindo visualização das células infectadas, por exemplo, células musculares.

Produção de proteínas in vivo

[00144]Como um exemplo não limitante, o AAV recombinante divulgado neste relatório pode ser usado para produzir uma proteína de interesse *in vivo*, por exemplo, em um animal, tal como um mamífero. Algumas modalidades fornecem um método para produzir uma proteína de interesse *in vivo*, onde o método inclui fornecer um AAV recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse; e administrar o AAV recombinante ao paciente, por meio do qual AAV recombinante expressa a proteína de interesse no paciente. O paciente pode ser, em algumas modalidades, um mamífero não humano, por exemplo, um macaco, um cão, um gato, um camundongo, ou uma vaca. O tamanho da sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse pode variar. Por exemplo, a sequência de nucleotídeos pode ser pelo menos cerca de 1,4 kb, pelo menos cerca de 1,5 kb, pelo menos cerca de 1,6 kb, pelo menos cerca de 1,7 kb, pelo menos cerca de 1,8 kb, pelo menos cerca de 2,0 kb, pelo menos cerca de 2,2 kb, pelo menos cerca de 2,4 kb, pelo menos cerca de 2,6 kb, pelo menos cerca de 2,8 kb, pelo menos cerca de 3,0 kb, pelo menos cerca de 3,2 kb, pelo menos cerca de 3,4 kb, ou pelo menos cerca de 3,5 kb em comprimento. Em algumas modalidades, o nucleotídeo apresenta pelo menos cerca de 1,4 kb em comprimento.

[00145]Conforme divulgado acima, a proteína de interesse não é, de qualquer forma, limitada. Por exemplo, a proteína de interesse pode ser um anticorpo, por exemplo, um anticorpo neutralizante viral. O AAV recombinante divulgado neste

relatório pode produzir altos níveis das proteínas de interesse *in vivo*. Por exemplo, a proteína de interesse pode ser expressado no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 9 µg/ml, pelo menos cerca de 10 µg/ml, pelo menos cerca de 50 µg/ml, pelo menos cerca de 100 µg/ml, pelo menos cerca de 200 µg/ml, pelo menos cerca de 300 µg/ml, pelo menos cerca de 400 µg/ml, pelo menos cerca de 500 µg/ml, pelo menos cerca de 600 µg/ml, pelo menos cerca de 700 µg/ml, pelo menos cerca de 800 µg/ml, pelo menos cerca de 900 µg/ml, ou pelo menos cerca de 1000 µg/ml. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de cerca de 9 µg/ml, cerca de 10 µg/ml, cerca de 50 µg/ml, cerca de 100 µg/ml, cerca de 200 µg/ml, cerca de 300 µg/ml, cerca de 400 µg/ml, cerca de 500 µg/ml, cerca de 600 µg/ml, cerca de 700 µg/ml, cerca de 800 µg/ml, cerca de 900 µg/ml, cerca de 1000 µg/ml, cerca de 1500 µg/ml, cerca de 2000 µg/ml, cerca de 2500 µg/ml, ou uma faixa entre quaisquer dois entre estes valores. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 9 µg/ml. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 100 µg/ml. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 500 µg/ml.

Aplicações de Diagnóstico

[00146]Em algumas modalidades, o vetor viral pode ser usado para gerar AAV recombinante expressando uma ou mais proteínas de interesse úteis em detectar uma doença ou transtorno e/ou monitorar a progressão de uma doença ou transtorno. Conforme usado neste relatório, o termo “diagnóstico” se refere à identificação da presença ou ausência de ou natureza de uma doença ou transtorno. Por exemplo, quando a proteína de interesse é um anticorpo, o vírus AAV recombinante pode ser usado para detectar um antígeno. A detecção de um antígeno (por exemplo, uma proteína de antígeno, uma sequência de ácidos nucleicos de antígeno, um peptídeo

de antígeno, um lipídeo de antígeno, um carboidrato de antígeno, e uma pequena molécula de antígeno) associada com uma doença ou transtorno fornece um meio de diagnosticar a doença ou transtorno. Tais métodos de detecção podem ser usados, por exemplo, para diagnóstico detecção da condição, para determinar se um paciente está pré-disposto a uma doença ou transtorno, para monitorar o progresso da doença ou transtorno ou o progresso dos protocolos de tratamento, para avaliar a severidade da doença ou transtorno, para prever o resultado de uma doença ou transtorno e/ou buscar a recuperação, ou auxiliar na determinação de um tratamento adequado para um paciente. A detecção pode ocorrer *in vitro* ou *in vivo*.

[00147]Doenças consideradas para diagnóstico em modalidades descritas neste relatório incluem, mas não são limitadas a qualquer doença em que um antígeno, tal como um antígeno associado com a doença, pode se ligar especificamente ao anticorpo de interesse. Por exemplo, o antígeno pode ser um antígeno tumoral, um antígeno viral, um antígeno microbiano, um alérgeno, e um autoantígeno. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno viral, tal como um antígeno de HIV. Em algumas modalidades, o antígeno é um antígeno associado ao tumor (TAA).

[00148]Muitos anticorpos para doenças são conhecidos e podem ser usados neste relatório como as proteínas de interesse. Por exemplo, anticorpos de peptídeo citrulinados anti-cíclicos (anti-CCP2) podem ser usados como a proteína de interesse para detectar artrite reumatoide.

[00149]Em algumas modalidades, a doença que será diagnosticada é um tipo de câncer, tal como, por exemplo, leucemia, carcinoma, linfoma, astrocitoma, sarcoma e, particularmente, sarcoma de Ewing, glioma, retinoblastoma, melanoma, tumor de Wilm, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de cólon, câncer hepatocelular, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de fígado, câncer de estômago, câncer cervical, câncer testicular, câncer de células renais e câncer

cerebral.

[00150]Em algumas modalidades, a doença que será diagnosticada está associada com infecção através de um parasita intracelular. Por exemplo, o parasita intracelular pode ser um vírus, tal como, por exemplo, um adenovírus, citomegalovírus, vírus Epstein-Barr, vírus do herpes simples (HSV), herpesvírus 6 humano, vírus varicela-zoster, vírus da hepatite, papilomavírus, parvovírus, poliomavírus, vírus do sarampo, vírus da rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), ou vírus da leucemia de células T humana. Em algumas modalidades, o parasita intracelular pode ser uma bactéria, protozoário, fungo, ou um príon. Mais particularmente, o parasita intracelular pode ser, por exemplo, Chlamydia, Listeria, Salmonella, Legionelose, Brucella, Coxiella, Rickettsia, Mycobacterium, Leishmania, Trypanasoma, Toxoplasma, e Plasmodium. Em algumas modalidades, a doença é malária.

[00151]Em algumas modalidades, o método para detectar uma doença em um paciente compreende selecionar um anticorpo para a doença que será detectada, inserindo um polinucleotídeo compreendendo a região codificante do anticorpo ao vetor viral divulgado neste relatório, produzindo um AAV recombinante a partir do vetor viral, infectar o AAV recombinante ao paciente, e determinar a presença ou ausência da doença no paciente com base na presença ou ausência de ligação específica entre o anticorpo e seu antígeno específico.

[00152]Muitos outros usos para anticorpos são bem conhecidos na técnica, incluindo aplicações terapêuticas, diagnósticas, judiciais, ambientais, e comerciais. Por exemplo, um antígeno, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pode se ligar a um anticorpo de interesse. Assim, métodos divulgados neste relatório podem ser usados para detectar a presença de um organismo e/ou um antígeno (por exemplo, polipeptídeos, carboidratos, lipídeos ou ácidos nucleicos), em uma amostra judicial/ambiental ou tecidos/células. Em algumas modalidades, os métodos podem ser usados na

produção do anticorpo que pode permitir a detecção de estado ativado de uma enzima.

[00153]Em algumas modalidades, os métodos podem ser usados para purificar proteínas, por exemplo, em escalas de laboratório ou industriais.

Aplicações Terapêuticas

[00154]O AAV recombinante e métodos descritos neste relatório podem ser usados para expressar uma ou mais proteína terapêuticas para prevenir ou tratar uma ou mais doenças ou transtornos em um paciente.

[00155]O AAV recombinante e métodos descritos neste relatório podem ser usados para inibir ou reduzir o risco de várias infecções virais. Algumas modalidades divulgam um método para reduzir ou inibir o risco de infecção de um vírus em um paciente, onde o método inclui fornecer um AAV recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo neutralizante para o vírus; e administrar o AAV recombinante ao paciente, por meio do qual AAV recombinante expressa o anticorpo no paciente. O AAV recombinante pode produzir alto nível de anticorpo neutralizante viral. Por exemplo, em algumas modalidades, o AAV recombinante pode se expressar no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 9 μg/ml, pelo menos cerca de 10 μg/ml, pelo menos cerca de 50 μg/ml, pelo menos cerca de 100 μg/ml, pelo menos cerca de 200 μg/ml, pelo menos cerca de 300 μg/ml, pelo menos cerca de 400 μg/ml, pelo menos cerca de 500 μg/ml, pelo menos cerca de 600 μg/ml, pelo menos cerca de 700 μg/ml, pelo menos cerca de 800 μg/ml, pelo menos cerca de 900 μg/ml, ou pelo menos cerca de 1000 μg/ml do anticorpo neutralizante viral. Em algumas modalidades, o anticorpo neutralizante viral é expressado no soro do paciente na quantidade de cerca de 9 μg/ml, cerca de 10 μg/ml, cerca de 50 μg/ml, cerca de 100 μg/ml, cerca de 200 μg/ml, cerca de 300 μg/ml, cerca de 400 μg/ml, cerca de 500 μg/ml, cerca de 600 μg/ml, cerca de 700 μg/ml, cerca de 800 μg/ml, cerca de 900 μg/ml, cerca de 1000 μg/ml, cerca de 1500 μg/ml, cerca de

2000 µg/ml, cerca de 2500 µg/ml, ou uma faixa entre quaisquer dois destes valores.

[00156]O método divulgado neste relatório pode, por exemplo, reduzir o risco de infecção no paciente em pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 3 vezes, pelo menos cerca de 4 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 8 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 15 vezes, pelo menos cerca de 20 vezes, pelo menos cerca de 25 vezes, ou pelo menos cerca de 30 vezes em comparação aos pacientes sem o tratamento viral. Em algumas modalidades, o método pode reduzir o risco de infecção no paciente em cerca de 2 vezes, cerca de 3 vezes, cerca de 4 vezes, cerca de 5 vezes, cerca de 8 vezes, cerca de 10 vezes, cerca de 15 vezes, cerca de 20 vezes, cerca de 25 vezes, cerca de 30 vezes, ou uma faixa entre quaisquer dois destes valores em comparação aos pacientes sem o tratamento viral. Em algumas modalidades, o método reduz o risco de infecção no paciente com o tratamento viral em pelo menos cerca de 5 vezes em comparação aos pacientes sem o tratamento viral. Em algumas modalidades, o método reduz o risco de infecção no paciente com o tratamento viral em pelo menos cerca de 20 vezes em comparação aos pacientes sem o tratamento viral. Em algumas modalidades, o método previne a infecção viral no paciente. Em algumas modalidades, o método inibe a infecção viral no paciente.

[00157]Exemplos não limitantes da infecção viral incluem infecções causadas por um vírus selecionado a partir de um adenovírus, um Alphaviridae, um Arbovirus, um Astrovirus, um Bunyaviridae, um Coronaviridae, um Filoviridae, um Flaviviridae, um Hepadnaviridae, um Herpesviridae, um Alphaherpesvirinae, um Betaherpesvirinae, um Gammaherpesvirinae, um Norwalk Virus, um Astroviridae, um Caliciviridae, um Orthomyxoviridae, um Paramyxoviridae, um Paramyxoviruses, um Rubulavirus, um Morbillivirus, um Papovaviridae, um Parvoviridae, um Picornaviridae, um Aphthoviridae, um Cardioviridae, um Enteroviridae, um Coxsackie vírus, um Polio Vírus, um Rhinoviridae, um Phycodnaviridae, um Poxviridae, um Reoviridae, um

Rotavírus, um Retroviridae, um Retrovírus Tipo A, um Vírus da Imunodeficiência, um Vírus da Leucemia, um Vírus de Sarcoma Aviário, um Rhabdovírus, um Rubiviridae, um Togaviridae, e quaisquer combinações dos mesmos. Exemplos não limitantes das infecções virais incluem infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecção por vírus da hepatite C (HCV), infecção por vírus da hepatite B (HBC), infecção por vírus Esptein Barr, vírus da infecção por influenza, infecção por vírus sincicial respiratório. Em algumas modalidades, a infecção viral é uma infecção viral por hepatite C. Em algumas modalidades, a infecção viral é uma infecção por HIV. Em algumas modalidades, a infecção viral é uma infecção por influenza.

[00158]Algumas modalidades fornecem um método para reduzir o risco de infecção viral em um paciente que foi exposto a um vírus (por exemplo, um paciente que entrou em contato com um outro paciente infectado com um vírus). Algumas modalidades fornecem um método para reduzir o risco de infecção viral em um paciente que será exposto a um vírus (por exemplo, um paciente que entrará em contato com um outro paciente infectado com um vírus). Em algumas modalidades, um método para prevenir a infecção viral é fornecido.

[00159]Os vetores virais, AAV recombinante e métodos descritos neste relatório podem ser usados para expressar uma ou mais proteínas terapêuticas para tratar várias doenças. Exemplos não limitantes das doenças incluem câncer, tal como carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma; e doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla. Exemplos não limitantes de carcinomas incluem carcinoma esofágico; carcinoma hepatocelular; carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas (vários tecidos); carcinoma da bexiga, incluindo carcinoma celular transicional; carcinoma broncogênico; carcinoma de cólon; carcinoma colorretal; carcinoma gástrico; carcinoma de pulmão, incluindo carcinoma de pequenas células e carcinoma de células não pequenas do pulmão; carcinoma adrenocortical; carcinoma da tireoide; carcinoma pancreático; carcinoma de mama; carcinoma de

ovário; carcinoma de próstata; adenocarcinoma; carcinoma das glândulas de suor; carcinoma de glândulas sebáceas; carcinoma papilar; adenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma; carcinoma medular; carcinoma de células renais; carcinoma do tubo *in situ* ou carcinoma do tubo bílico; coriocarcinoma; seminoma; carcinoma embrionário; tumor de Wilm; carcinoma cervical; carcinoma uterino; carcinoma testicular; carcinoma osteogênico; carcinoma epitelial; e carcinoma nasofaríngeo. Exemplos não limitantes de sarcomas incluem fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, cordoma, sarcoma osteogênico, osteossarcoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfongiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, e outros sarcomas de tecidos moles. Exemplos não limitantes de tumores sólidos incluem glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, e retinoblastoma. Exemplos não limitantes de leucemias incluem síndromes mieloproliferativas crônicas; leucemias mielógenas agudas; leucemias linfocíticas crônicas, incluindo CLL de células B, CLL de células T leucemia prolinfocítica, e leucemia de células pilosas; e leucemias linfoblásticas agudas. Exemplos de linfomas incluem, mas não são limitados a, linfomas de células B, tais como linfoma de Burkitt; linfoma de Hodgkin; e semelhantes. Outros exemplos não limitantes das doenças que podem ser tratadas usando os vetores de AAV, vírus recombinantes e métodos divulgados neste relatório incluem transtornos genéticos, incluindo anemia falciforme, fibrose cística, deficiência 1 de ácido lipase lisossomal (LAL), doença de Tay-Sachs, Fenilcetonúria, Mucopolissacaridose, doenças de armazenagem de glicogênio (GSD, por exemplo, GSD tipos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, e XIV), Galactosemia, distrofia muscular (por exemplo, distrofia muscular de Duchenne), e hemofilia.

[00160]A quantidade da proteína de interesse expressa no paciente (por

exemplo, no soro do paciente) pode variar. Por exemplo, em algumas modalidades, a proteína pode ser expressa no soro do paciente na quantidade de pelo menos cerca de 9 µg/ml, pelo menos cerca de 10 µg/ml, pelo menos cerca de 50 µg/ml, pelo menos cerca de 100 µg/ml, pelo menos cerca de 200 µg/ml, pelo menos cerca de 300 µg/ml, pelo menos cerca de 400 µg/ml, pelo menos cerca de 500 µg/ml, pelo menos cerca de 600 µg/ml, pelo menos cerca de 700 µg/ml, pelo menos cerca de 800 µg/ml, pelo menos cerca de 900 µg/ml, ou pelo menos cerca de 1000 µg/ml. Em algumas modalidades, a proteína de interesse é expressa no soro do paciente na quantidade de cerca de 9 µg/ml, cerca de 10 µg/ml, cerca de 50 µg/ml, cerca de 100 µg/ml, cerca de 200 µg/ml, cerca de 300 µg/ml, cerca de 400 µg/ml, cerca de 500 µg/ml, cerca de 600 µg/ml, cerca de 700 µg/ml, cerca de 800 µg/ml, cerca de 900 µg/ml, cerca de 1000 µg/ml, cerca de 1500 µg/ml, cerca de 2000 µg/ml, cerca de 2500 µg/ml, ou uma faixa entre quaisquer dois entre estes valores. Um técnico habilitado entenderá que o nível de expressão em que uma proteína de interesse é necessária para o método ser eficaz pode variar dependendo dos fatores não limitantes, tais como a proteína de interesse particular e o paciente que recebe o tratamento, e uma quantidade eficaz da proteína pode ser facilmente determinada por um técnico habilitado usando métodos convencionais conhecidos no ramo sem experimentação indevida.

[00161]Um técnico habilitado avaliará se um ou mais entre os vetores virais e AAV recombinante podem ser usados juntos nas aplicações descritas neste relatório. Por exemplo, vírus AAV recombinantes expressando proteínas de interesse diferentes ou subunidade diferente de uma proteína de interesse podem ser administrados ao mesmo paciente para propósitos diagnósticos e/ou terapêuticos. Em algumas modalidades, os vírus recombinantes são coadministrados ao paciente. Em algumas modalidades, os vírus recombinantes são administrados ao paciente separadamente. Em algumas modalidades, um primeiro AAV recombinante expressando uma primeira proteína de interesse e um segundo AAV recombinante expressando uma segunda

proteína de interesse podem ser administrados ao paciente juntos ou separadamente, em que a primeira proteína de interesse e a segunda proteína de interesse podem ser as mesmas ou diferentes. Em algumas modalidades, a primeira proteína de interesse é um anticorpo neutralizante anti-HIV e a segunda proteína de interesse é um anticorpo neutralizante anti-HIV diferente. Em algumas modalidades, a primeira proteína de interesse é um anticorpo neutralizante anti-influenza e a segunda proteína de interesse é um anticorpo neutralizante anti-influenza diferente. Em algumas modalidades, um primeiro AAV recombinante expressando uma primeira subunidade da proteína de interesse e um segundo AAV recombinante expressando uma segunda subunidade da proteína de interesse podem ser administrados ao paciente juntos ou separadamente.

Composição Farmacêutica e Método de Administração

[00162]Também divulgadas neste relatório são composições farmacêuticas compreendendo os vírus AAV recombinantes divulgados neste relatório e um portador farmaceuticamente aceitável. As composições também podem compreender ingredientes adicionais, tais como diluentes, estabilizadores, excipientes, e adjuvantes. Conforme usado neste relatório, portadores, excipientes, diluentes, adjuvantes, ou estabilizadores “farmaceuticamente aceitáveis” são aqueles não tóxicos à célula ou paciente exposto aos mesmos (preferivelmente, inertes) nas dosagens e concentrações utilizadas ou que têm um nível aceitável de toxicidade, conforme determinado pelo praticante habilitado.

[00163]Os portadores, diluentes e adjuvantes podem incluir tampões, tais como fosfato, citrato, ou outros ácidos orgânicos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico; polipeptídeos de baixo peso molecular (por exemplo, menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como soro albumina, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros

carboidratos, incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; álcoois de açúcar, tais como manitol ou sorbitol; contraíons formadores de sal, tais como sódio; e/ou tensoativos não iônicos, tais como Tween™, Pluronics™ ou polietilenoglicol (PEG). Em algumas modalidades, o portador fisiologicamente aceitável é uma solução tamponado com pH aquosa.

[00164]Títulos do vírus AAV recombinante que serão administrados variarão dependendo, por exemplo, do vírus AAV recombinante particular, do modo de administração, do objetivo do tratamento, do indivíduo, e do tipo celular que será alvejado, e podem ser determinados por métodos padrão na técnica.

[00165]Conforme será facilmente evidente a uma pessoa habilitada na técnica, a dosagem *in vivo* útil do vírus recombinante que será administrada e o modo particular de administração variarão dependendo da idade, peso, severidade da aflição, e espécie do animal tratado, dos vírus recombinante particular expressando a proteína de interesse que é usada, e do uso específico para qual o vírus recombinante é utilizado. A determinação do nível de dosagens eficazes, que é os níveis de dosagem necessários para obter o resultado desejado, pode ser realizada por uma pessoa habilitada na técnica usando métodos farmacológicos de rotina. Tipicamente, aplicações clínicas humanas dos produtos são iniciadas em níveis de dosagem mais baixos, com nível de dosagem sendo aumentado até que o efeito desejado seja obtido. Alternativamente, estudos *in vitro* aceitáveis podem ser usados para estabelecer doses úteis e vias de administração das composições identificadas pelos presentes métodos usando métodos farmacológicos estabelecidos.

[00166]Embora a dosagem exata seja determinada em uma base fármaco por fármaco, na maioria dos casos, algumas generalizações com respeito à dosagem podem ser feitas. Em algumas modalidades, o AAV recombinante expressando uma proteína de interesse pode ser administrado por intermédio de injeção a um paciente em uma dose entre $1x10^{11}$ cópias de genoma (GC) do vírus recombinante por kg do

paciente e $1x10^{13}$ GC por kg, por exemplo, entre $5x10^{11}$ GC/kg e $5x10^{12}$ GC/kg.

[00167]Os vírus recombinantes divulgados neste relatório podem ser administrados a um paciente (por exemplo, um ser humano) em necessidade dos mesmos. A via da administração não é particularmente limitada. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz dos vírus recombinantes pode ser administrada ao paciente por vias padrão na técnica. Exemplos não limitantes da via incluem intramuscular, intravaginal, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, epicutânea, intradérmica, retal, intraocular, pulmonar, intracraniana, intraóssea, oral, bucal, ou nasal. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é administrado ao paciente por injeção intramuscular. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é administrado ao paciente por injeção intravaginal. Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado ao paciente pela via parenteral (por exemplo, por injeção intravenosa, intramuscular ou subcutânea), por escarificação de superfície ou por inoculação em uma cavidade do corpo do paciente. Via(s) de administração e sorotipo(s) de componentes de AAV do vírus AAV recombinante podem ser facilmente determinados por uma pessoa habilitada na técnica levando em consideração a infecção e/ou estado da doença que será tratado e as células/tecido(s) alvos que podem expressar a proteína de interesse. Em algumas modalidades, o vírus recombinante é administrado às células musculares.

[00168]A administração real do vírus AAV recombinante pode ser realizada através do uso de qualquer método físico que transportará o vírus AAV recombinante no tecido alvo do paciente. Por exemplo, o vírus AAV recombinante pode ser injetado no músculo, na corrente sanguínea, e/ou diretamente no fígado. As proteínas de capsídeo do vírus AAV recombinante podem ser modificadas, de modo que o vírus AAV recombinante seja alvejado a um tecido alvo particular de interesse, tal como músculo e vagina. As composições farmacêuticas podem ser preparadas como formulações injetáveis ou como formulações tópicas que serão liberadas aos

músculos através de transporte transdérmico.

[00169]Para a injeção intramuscular, soluções em um adjuvante, tais como óleo de gergelim ou de amendoim ou em propilenoglicol aquoso, podem ser utilizadas, assim como soluções aquosas estéreis. Tais soluções aquosas podem ser tamponadas, se desejado, e o diluente líquido primeiro tornado isotônico com solução salina ou glicose. Soluções do vírus AAV recombinante como um ácido livre (o DNA contém grupos fosfato ácido) ou um sal farmacologicamente aceitável podem ser preparadas em água adequadamente misturada com um tensoativo, tal como hidroxpropilcelulose. Uma dispersão do vírus AAV recombinante também pode ser preparada em glicerol, polietilenoglicóis líquidos e misturas dos mesmos e em óleos. Sob condições habituais de armazenagem e uso, estas preparações contêm um preservante para prevenir o crescimento de microrganismos.

[00170]O vírus recombinante que será usado pode ser utilizado na forma líquida ou liofilizada (em combinação com um ou mais preservantes e/ou agentes de proteção adequados para proteger o vírus durante o processo de liofilização). Para a terapia de gene (por exemplo, de transtornos neurológicos que podem ser melhorados por um produto de gene específico), uma dose terapeuticamente eficaz do vírus recombinante expressando a proteína terapêutica é administrada a um hospedeiro em necessidade de tal tratamento. O uso do vírus recombinante divulgado neste relatório na fabricação de um medicamento para induzir imunidade em, ou fornecer terapia de gene a um hospedeiro está no escopo do presente pedido.

[00171]Em exemplos onde dosagens humanas para os vírus AAV recombinantes foram estabelecidas para pelo menos alguma condição, aquelas mesmas dosagens, ou dosagens que estão entre cerca de 0,1% e 500%, mais preferivelmente, entre cerca de 25% e 250% da dosagem humana estabelecida, podem ser usadas. Onde nenhuma dosagem humana é estabelecida, como será o caso para as composições farmacêuticas recém descobertas, uma dosagem humana

adequada pode ser inferida a partir de valores ED_{50} ou ID_{50}, ou outros valores apropriados derivados de estudos *in vitro* ou *in vivo*, conforme qualificado por estudos de toxicidade e estudos de eficácia em animais.

[00172]Uma terapeuticamente quantidade eficaz do AAV recombinante pode ser administrada a um paciente em vários pontos de tempo. Por exemplo, o AAV recombinante pode ser administrado ao paciente antes, durante, ou depois da infecção por um vírus. O AAV recombinante também pode ser administrado ao paciente antes, durante, ou depois da ocorrência de uma doença (por exemplo, câncer). Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado ao paciente durante a remissão do câncer. Em algumas modalidades, o AAV recombinante é administrado antes da infecção pelo vírus para imunoprofilaxia.

[00173]A frequência de dosagem do vírus AAV recombinante pode variar. Por exemplo, o vírus AAV recombinante pode ser administrado ao paciente cerca de uma vez a cada semana, cerca de uma vez a cada duas semanas, cerca de uma vez a cada mês, cerca de uma vez a cada seis meses, cerca de uma vez a cada ano, cerca de uma vez a cada dois anos, cerca de uma vez a cada três anos, cerca de uma vez a cada quatro anos, cerca de uma vez a cada cinco anos, cerca de uma vez a cada seis anos, cerca de uma vez a cada sete anos, cerca de uma vez a cada oito anos, cerca de uma vez a cada nove anos, cerca de uma vez a cada dez anos, ou cerca de uma vez a cada quinze anos. Em algumas modalidades, o vírus AAV recombinante é administrado ao paciente no máximo cerca de uma vez a cada semana, no máximo cerca de uma vez a cada duas semanas, no máximo cerca de uma vez a cada mês, no máximo cerca de uma vez a cada seis meses, no máximo cerca de uma vez a cada ano, no máximo cerca de uma vez a cada dois anos, no máximo cerca de uma vez a cada três anos, no máximo cerca de uma vez a cada quatro anos, no máximo cerca de uma vez a cada cinco anos, no máximo cerca de uma vez a cada seis anos, no máximo cerca de uma vez a cada sete anos, no máximo cerca de uma vez a cada oito

anos, no máximo cerca de uma vez a cada nove anos, no máximo cerca de uma vez a cada dez anos, ou no máximo cerca de uma vez a cada quinze anos.

Exemplo

[00174]Modalidades adicionais são divulgadas em mais detalhes nos exemplos seguintes, que não são intencionados a limitar o escopo das reivindicações.

Materiais Experimentais e Métodos

[00175]Os materiais experimentais e métodos seguintes foram usados para os Exemplos 1 a 9 descritos abaixo.

Quantificação e validação funcional de AAV

[00176]O AAV purificado foi quantificado por qPCR usando o procedimento geral seguinte. Alíquotas congeladas de AAV foram descongeladas e diluídas dez vezes em tampão de digestão contendo 10 unidades de DNase I (Roche) e incubadas a 37 ºC durante 30 minutos. Os vírus digeridos com DNase foram diluídos em série e 5 ml de cada diluição foram usados em uma reação qPCR 15 µl com PerfeCTa SYBR Green SuperMix, ROX (Quanta Biosciences) e os *primers* designados contra o acentuador de CMV (5' CMV: AACGCCAATAGGGACTTTCC (SEQ ID NO: 31) e 3' CMV: GGGCGTACTTGGCATATGAT (SEQ ID NO: 32)) ou o transgene de luciferase (5' Luc: ACGTGCAAAAGAAGCTACCG (SEQ ID NO: 33) e 3' Luc: AATGGGAAGTCACGAAGGTG (SEQ ID NO: 34). As amostras foram conduzidas em duplicata em um Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System. As condições de ciclização seguintes foram usadas: um ciclo de 50 ºC durante 2 minutos, um ciclo de 95ºC durante 10 minutos, 40 ciclos de 95ºC durante 15 segundos e 60ºC durante 60 segundos. O título do vírus foi determinado em comparação com uma curva padrão gerada usando um corte de fragmento de DNA purificado com *Xho*I/*Nhe*I a partir do vetor de expressão de luciferase pVIP ou um padrão de referência consistindo em AAV2/8 purificado expressando anticorpo 4E10 previamente titulado contra o DNA padrão.

[00177]Para validar a atividade funcional de cada lote do vírus titulado, ensaios de infecção *in vitro* foram realizados usando células 293T e a concentração do anticorpo foi medida no sobrenadante celular. Vinte e quatro horas antes da infecção, placas de 12 poços foram semeadas com células 500K em 1 ml de meio. Duas horas antes da infecção, o meio foi substituído com 500 µl por poço de meio fresco. Cópias de genoma (10^{11}) de cada vírus foram adicionadas a cada poço e deixadas infectar durante 6 dias. Sobrenadantes foram removidos e quantificados para a produção de IgG total através de ELISA.

Cepas de camundongo

[00178]Camundongos imunodeficientes NOD/SCID/γc (NSG), imunocompetentes C57BL/6 (B6) e Balb/C foram obtidos a partir do Jackson Laboratory. Camundongos imunodeficientes Rag2/γc foram obtidos a partir da A. Berns.

Injeção intramuscular de AAV e imageamento bioluminescente

[00179]Alíquotas de vírus previamente titulados foram descongeladas lentamente em gelo e diluídas em TFB2 para obter a dose pré-determinada em um volume de 40 µl. Os camundongos foram anestesiados por inalação com isofluorano e uma injeção de 40 µl única foi administrada no músculo gastrocnêmio com uma seringa de insulina 28G. Em vários momentos depois da administração do vetor, os camundongos foram submetidos à sangria para determinar a concentração de anticorpo no soro ou visualmente representada usando um sistema de imageamento Xenogen IVIS 200 Series (Caliper Life sciences). Para a imagem, os camundongos foram anestesiados por inalação com isofluorano e fornecidos 100 µl de 15 mg ml^{-1} D-luciferina (Ouro Biotechnology) através de injeção intraperitoneal. As imagens foram tomadas entre 5 e 10 minutos depois da injeção de D-luciferina.

Quantificação da produção de anticorpo através de ELISA

[00180]Para a detecção de IgG humana total, placas de ELISA foram

revestidas com 1 µg por poço de anticorpo anti-IgG humana-Fc de cabra (Bethil) durante 1 hora. As placas foram bloqueadas com BSA a 1% (KPL) em TBS durante pelo menos 2 horas. As amostras foram incubadas durante 1 hora na temperatura ambiente em TBST contendo BSA a 1% (KPL), depois incubadas durante 30 minutos com anticorpo de cadeia leve capa anti-humana de cabra conjugado à HRP (Bethil). A amostra foi detectada com Sistema TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL). Uma curva padrão foi gerada usando Soro de Referência Humano (Lote 3, Bethil) ou IgG/Capa Humana purificada (Bethil).

[00181]Para a detecção de IgG de ligação a gp120, placas de ELISA foram revestidas com 0,04 a 0,10 µg por poço de proteína HIV-1 gp120MN (Protein Sciences) durante 1 hora. As placas foram bloqueadas com BSA a 1% (KPL) em TBS durante pelo menos 2 horas. As amostras foram incubadas durante 1 hora na temperatura ambiente em TBST contendo BSA a 1% (KPL), depois incubadas durante 30 minutos com anticorpo anti-IgG humana-Fc de cabra conjugado à HRP (Bethil). A amostra foi detectada com Sistema TMB Microwell Peroxidase Substrate (KPL). Uma curva padrão foi gerada usando proteína b12 ou VRC01 purificada, conforme apropriado para as amostras.

Produção e titulação do vírus HIV

[00182]Células 293T foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, mistura de penicilina-estreptomicina a 1% (Mediatech), glutamina a 1% (Mediatech) em um incubador de CO_2 a 5% a 37ºC. Três dias antes da transfecção, duas placas de 15 cm foram semeadas com 3,75 x 10^6 células cada em 25 ml de meio. Duas horas antes da transfecção, o meio foi modificado para 15 ml de novo meio. Quarenta microgramas do plasmid36 pNL4-3 codificando um clone infeccioso molecular de HIV foram transfectados usando reagente Trans-IT (Mirus), de acordo com as instruções do fabricante. As coletas de sobrenadante foram realizadas em 24, 48 e 72 horas depois da transfecção e 15 ml de meio fresco foram

suavemente adicionados à placa depois de cada coleta. Sobrenadantes agrupados foram filtrados usando um filtro de 0,45 μm para remover resíduos celulares e aliquotados para armazenagem a -80°C. HIV foi quantificado seguindo as instruções do fabricante usando um kit Alliance HIV-1 p24 antigen ELISA (Perkin-Elmer).

Ensaio de proteção de HIV in vitro

[00183]Os ensaios de neutralização *in vitro* em células repórteres de luciferase foram realizados de acordo com o procedimento típico descrito como segue. Células TZM-bl a partir do National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program foram mantidas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, mistura de penicilina-estreptomicina a 1% (Mediatech), glutamina a 1% (Mediatech) em um incubador de CO_2 a 5% a 37°C. Antes dos ensaios, as células TZM-bl foram tripsinzadas, contadas e recolocadas em suspensão em uma concentração de 105 células per mililitro, em um volume total de 15 ml. As células foram misturadas com 75 μg ml^{-1} DEAE-dextrano e concentrações variadas de cada anticorpo, conforme indicado, e deixadas incubar em gelo durante a preparação do vírus. Para preparar as diluições do vírus, NL4-3 estoque foi diluído a 250 ng ml^{-1} em meio de crescimento e subsequentemente diluído quatro vezes em série na placa de ensaio. Cem microlitros de meio contendo 10.000 células pré-incubadas com anticorpo foram adicionados aos poços contendo vírus previamente diluído. A infecção foi deixada proceder durante 48 horas em um incubador de CO_2 5% a 37°C. Antes da leitura da placa, 100 ml de reagente BriteLite (Perkin Elmer) foram adicionados a cada poço, e a placa foi incubada durante 2 minutos na temperatura ambiente. Cento e vinte microlitros de cada poço depois foram transferidos para uma placa opaca e lidos por VICTOR3 (leitor de placa Wallac 1420 VICTOR3, PerkinElmer).

Produção de camundongos humanizados para desafio in vivo

[00184]Camundongos humanizados foram produzidos essencialmente de acordo com o procedimento descrito como segue. Células sanguíneas mononucleares

periféricas humanas (AllCells) foram descongeladas a partir de -80°C, expandidas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, mistura de penicilina-estreptomicina a 1 % (Mediatech), glutamina a 1% (Mediatech), β-mercaptoetanol 50 µM, HEPES(Gibco) 10 mM, 13 aminoácidos não essenciais (Gibco), 13 piruvato de sódio (Gibco) e estimuladas para expansão de células T com 5 µg ml^{-1} de fitohemaglutinina (Sigma) e 10 ng ml^{-1} de IL-2 humana (Peprotech) em um incubador de CO_2 a 5% a 37°C. As células foram expandidas durante 7 a 13 dias antes do uso. Para enxerto, 2 milhões a 4 milhões de células foram injetados intraperitonealmente em camundongos NSG em um volume de 300 ml de meio.

Experimentos de proteção de HIV

[00185]Um dia antes do desafio com HIV, amostras sanguíneas a partir de cada camundongo foram submetidas à ELISA para quantificação do anticorpo e citometria de fluxo para determinar razões de CD4/CD8 de referência. No dia seguinte, os camundongos foram desafiados através de injeção intraperitoneal ou intravenosa de 100 µl contendo a dose especificada de HIV diluído em PBS. Os camundongos infectados foram submetidos a amostragem de sangue semanalmente para determinar a razão de células CD4 para CD8 no subconjunto linfócitos T através de citometria de fluxo.

Citometria de fluxo

[00186]Amostras sanguíneas foram tomadas a partir de camundongos por sangria retro-orbital e foram centrifugadas durante 5 minutos a 1,150 g em uma microcentrífuga para separar plasma das pelotas celulares. O plasma foi removido e congelado para análise futura e as pelotas celulares foram recolocadas em suspensão em 1,1 ml de 1 × RBC tampão de lise (Biolegend) e incubadas em gelo durante pelo menos 10 minutos para remover glóbulos vermelhos. Depois da lise, as amostras foram peletizadas a 1,150g em uma microcentrífuga durante 5 minutos na temperatura ambiente, e pigmentadas com 65 µl de um coquetel contendo 5 µl de anticorpos anti-

humanos CD3-FITC, 5 µl de anti-humanos CD4-PE, 5 µl de anti-humanos CD8a-APC (Biolegend) e 50 µl de solução salina tamponada com fosfato suplementada com soro fetal bovino a 2% (PBS1). As amostras foram lavadas com 1 ml de PBS+ e novamente peletizadas a 1,150g em uma microcentrífuga durante 5 minutos. As células peletizadas foram recolocadas em suspensão em 200 µl de PBS+ suplementada com 2 µg ml^{-1} de iodeto de propídio (Invitrogen) e analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton-Dickinson). As amostras foram primeiro ativadas por expressão de CD3 antes de determinar a razão de células CD4 para CD8 dentro deste subconjunto. As amostras contendo menos do que 20 eventos de $CD3^+$ foram excluídas da análise.

Pigmentação histológica para HIV p24

[00187]Na conclusão dos experimentos de desafio *in vivo*, baços foram removidos dos camundongos e imersos em formalina tamponada neutra a 10% durante 24 horas. Depois da fixação, os tecidos foram removidos e colocados em etanol a 70 % até embeber e processar parafina padrão. Seções (4 mm de espessura) depois foram tomadas e a pigmentação imunohistoquímica foi realizada para a detecção de HIV-p24 usando o anticorpo monoclonal de murino Kal-1 e técnicas de recuperação de antígeno padrão. As lâminas foram examinadas por um patologista (D.S.R.) em um microscópio Olympus BX51 e as imagens obtidas usando uma Câmera SPOT Insight Digital (Diagnostic Instruments).

Exemplo 1

Construção e clonagem de vetores transferidores de AAV modulares

[00188]Para construir os vetores transferidores de AAV, os oligonucleotídeos que codificam a repetição 1 terminal invertida derivada de AAV2 (ITR1) de 145 pares de base (bp) na orientação ‘flip’ e ITR2 na orientação ‘flop’ flanqueados através de sítios de restrição únicos foram sintetizados (Tecnologias de DNA Integradas) e recozidos antes de ligar no vetor de plasmídeo PBR322. Subsequentemente,

promotores, transgenes e sinais de poliadenilação flanqueados através de sítios compatíveis foram amplificados por PCR e clonados entre os ITRs, resultando em um vetor transferidor de AAV modular, em que as combinações únicas de sítios de restrição flanqueados cada elemento.

[00189]Para avaliar a expressão potencial de vários promotores em expressão muscular, uma série de vetores que carregam o gene da luciferase impulsionado por um painel de promotores ubíquos e tecidos específicos foi preparado. Estes vetores foram administrados intramuscularmente por intermédio de uma injeção unitária no músculo gastrocnêmio e a expressão de luciferase foi monitorada para determinar a expressão potencial relativa de cada promotor neste tecido alvo. O promotor adiantado imediato de citomegalovírus (CMV), promotores de β-actina de galinha quiméricos (CAG), e de ubiquitina C (UBC) forneceram expressão muscular forte (Fig. 1A).

[00190]Um novo promotor de CASI sintético (cerca de 1,05 kb em comprimento) (Fig. 1B) foi gerado. O promotor de CASI consiste do promotor adiantado imediato de citomegalovírus (CMV) seguido por um fragmento de promotor β-actina de galinha (CAG) contendo o sítio de iniciação de transcrição. Esta fusão é imediatamente seguida por um íntron sinteticamente designado que utiliza sequências consenso de doador de *splice* e aceitante de *splice* flanqueando a região acentuador dos promotores de ubiquitina C (UBC) humana. O teste *in vivo* demonstrou que o promotor de CASI foi consideravelmente mais ativo no músculo do que o promotor de CAG apesar de ser 34 % mais compacto (Fig. 1C). O elemento regulador pós transcricional de vírus de hepatite de marmota (WPRE) depois foi incorporado no vetor transferidor de AAV, que significantemente intensificou a expressão de transgenes (Fig. 1D).

[00191]As eficiências de vários sinais de poliadenilação também foram examinadas quanto à expressão derivadas do músculo. O poli(A) tardio de SV40, o

poli(A) da beta-globina de coelho (RBG) e o poli(A) do hormônio de crescimento de bovino (BGH) demonstraram níveis comparáveis de expressão (Fig. 1D).

[00192]A Fig. 1E mostra uma ilustração esquemática de uma porção do vetor de expressão muscular otimizado que codifica um andaime de IgG1, em que as regiões V de cadeia pesada e leve derivadas de anticorpos monoclonais podem ser inseridas.

[00193]A Fig. 2 mostra uma apresentação esquemática do mapa de um vetor de expressão muscular otimizado com um transgene de luciferase inserido. Conforme mostrado na Figura 2 Suplementar, o vetor tem sítios de restrição únicos flanqueando cada elemento modular (*por exemplo, Xho*I, *Spe*I, *Not*I, *BamH*I, *Acc*65I, *Hind*III, e *Nhe*I). Neste vetor, as sequências de AAV começam imediatamente após o sítio de restrição de *Xho*I com uma repetição terminal invertida (ITR) de “flip” de 145bp de AAV2 seguido por um sítio de restrição de *Spe*I e o promotor de CASI. O promotor de CASI é seguido por um sítio de restrição de *Not*I e um resíduo C adicional após à sequência de identificação consenso do sítio de clivagem GCGGCCGC (SEQ ID NO: 35) para imitar uma sequência consenso de Kozak antes de ATG do transgene de luciferase. A extremidade 3’ do transgene é concluída com um códon de terminação TAA seguido por um resíduo A adicional antes do sítio *BamH*I. O elemento WPRE segue este sítio de restrição e continua até que um sítio de restrição *Acc*65I que precede um sinal de poliadenilação tardia de SV40 e sítio de restrição HindIII. Além disso, uma segunda ITR de “flop” de AAV2 de 145bp está localizada antes de um sítio *Nhe*I.

Exemplo 2

Produção e purificação de vírus AAV recombinante

[00194]Vírus AAV recombinante foi produzido e purificado de sobrenadantes de cultura de acordo com o procedimento conforme descrito no seguinte.

[00195]As células 293T foram mantidas em meio DMEM suplementado com

soro fetal bovino a 10%, mistura de penicilina-estreptomicina a 1% (Mediatech) e glutamina a 1% (Mediatech) em uma incubadora de CO_2 a 5% a 37ºC. Três dias antes da transfecção, quatro placas de 15 cm foram semeadas com células de 3,75 x 10^6 cada em meios de 25 ml. Alternativamente, as células de 1,875 x 10^6 podem ser plaqueadas por placa quatro dias antes do dia da transfecção (células 7,5 x 10^6 plaqueadas por vírus). Duas horas antes da transfecção, os meios foram mudados para 15 ml de meios novos.

[00196]O vetor transferidor de AAV foi co-transfectado com vetores auxiliares adenovirais (pHELP (Applied Viromics) ou pAd-delta-F6) e plasmídeo auxiliar que expressa os produtos do gene Rep e Cap de AAV (pAAV 2/8 SEED) em uma razão de 0,25:1:2 usando reagente de transfecção BioT (Bioland Scientific). A quantidade total de DNA usada por transfecção foi 80 μg. Cinco coletas de vírus AAV foram realizadas a 36, 48, 72, 96 e 120 horas após à transfecção. Para cada ponto no tempo, os meios foram filtrados através de um filtro 0,2 μm e 15 ml de meios novos foram suavemente adicionados à placa.

[00197]Após à coleta, aproximadamente 75 ml de 5 × solução de PEG (polietilenoglicol a 40%, NaCl 2,5M) foi adicionado ao volume total de sobrenadante coletado (~ 300 ml) e o vírus foi precipitado em gelo durante pelo menos 2 horas. O vírus precipitado foi peletizado a 7,277g durante 30 minutos (Sorvall RC 3B Plus, H-6000A rotor) e recolocado em suspensão em 1,37 g ml^{-1} de cloreto de césio. O vírus recolocado em suspensão foi uniformemente dividido em dois tubos Quick-Selar (Beckman) e submetido à rotação a 329,738g a 20 ºC durante 24 horas (Beckman Coulter, Optima LE-80K, 70Ti rotor). As frações de 100 a 200 ml foram coletadas em uma placa de cultura de tecido de fundo plano de 96 poços, e um refratômero foi usado para quantificar o índice refrativo de 5 ml de cada fração. Os poços exibiram índice refrativos entre 1,3755 e 1,3655, e foram combinados e diluídos a um volume final de 15 ml usando Tampão de Formulação de Teste 2 (TFB2, citrato de sódio 100 mM, Tris

10 mM, pH 8). O vírus foi carregado em filtros de centrífugas MWCO 100 kDa (Millipore) e submetido à centrifugação a 500 g a 4ºC até que 1 ml de retentato permaneceu. O vírus retido depois foi novamente diluído a um volume total de 15 ml em TFB2 e este processo foi repetido tal que o vírus foi lavado três vezes. O volume final de retentato foi entre 500 a 1000 ml total, que foi fracionado e armazenado a -80ºC.

Exemplo 3

Otimização do transgene de anticorpo

[00198]Para criar uma estrutura ideal para a expressão de anticorpo, as cadeias pesadas e leves de vários anticorpos de HIV amplamente neutralizantes separadas por uma sequência de peptídeos alto-processamento de F2A foram clonadas em um vetor de expressão de mamíferos sob o controle do promotor de CMV. As células 293T transfectadas com estes vetores demonstraram secreção de IgG humana no sobrenadante de cultura que pode ser detectado por ELISA (Fig. 3A). Para melhorar a expressão, a sequência de F2A foi re-engendrada para refletir melhor o uso de códon de mamífero e incorporou um sítio de clivagem de furina no N-terminal para o processamento ideal. A comparação dos vetores com sequência de F2A otimizada (SEQ ID NO: 9) ao vetor com sequência de F2A padrão (SEQ ID NO: 10) através da transfecção mostrou que os vetores com sequência de F2A otimizada produziu níveis mais altos de todos os quatro anticorpos testados.

[00199]Para melhorar a secreção do anticorpo, as sequências sinais de endógeno foram substituídas com uma sequência otimizada de códon derivada de hormônio de crescimento humano (HGH) e criou versões do vetor de expressão 4E10, em que a cadeia pesada, a cadeia leve, ou ambas as cadeias foram conduzidas através de sequências sinais de HGH separadas e compararam sua expressão por transfecção. Para minimizar sequência repetitiva nos vetores, duas sequências de HGH (SEQ ID NOs: 11 e 12) foram sintetizadas, que tiveram sequências de

nucleotídeos distintas, porém codificaram aminoácidos idênticos, e cada uma foi usada para a cadeia pesada ou leve exclusivamente. A substituição das sequências sinais de endógeno com sequências de HGH nas cadeias pesadas ou leves resultou em níveis mais altos de produção de anticorpo, e a substituição de sequência sinal de ambas as cadeias produziu o melhor resultado (Fig. 3B).

[00200]Para remover o potencial para a *splice* imprópria da transcrição que codifica o anticorpo, a sequência foi submetida à predição de *splice* de silico e removeu todo o doador de *splice* potencial e as sequências aceitantes através do uso de mutações conservativas ao sítio ou, quando esta não foi possível, as sequências adjacentes. A expressão melhorada do anticorpo 4E10 foi observada quando colocada nesta estrutura otimizada por *splice* (Fig. 3C).

[00201]Uma ilustração esquemática da estrutura do transgene de anticorpo final é mostrada na Fig. 3D. Conforme mostrado na Fig. 3D, o transgene de anticorpo consiste de uma sequência sinal de HGH seguido por uma região VH permutável, uma região constante de cadeia pesada otimizada por *splice*, um sítio de clivagem de furina ligado a um peptídeo de F2A otimizado que é fundido a uma segunda sequência sinal de HGH, uma região VL permutável, e uma região constante de cadeia leve capa otimizada por *splice*.

[00202]Para confirmar que as otimizações descritas acima feitas para melhorar a expressão do gene não afeta a eficácia da neutralização dos anticorpos, vários anticorpos amplamente neutralizantes bem estudados (por exemplo, anticorpos anti-HIV de b12, 2G12, 4E10 e 2F5) foram expressos de vetor de expressão otimizado. Os anticorpos produzidos foram purificados e testados em um ensaio de proteção *in vitro* usando células repórteres de luciferase TZM-bl. As células que carregam um gene da luciferase sob o controle de elementos transcricionais induzidos por HIV (células TZM-bl) foram incubadas com diluições de cada anticorpo antes da inoculação com quantidades crescentes de HIV. As células foram plaqueadas com

várias concentrações dos anticorpos antes da inoculação com tituladores crescentes de cepa de HIV de NL4-3. Dois dias após à inoculação, as células foram lisadas e quantificadas para a atividade de luciferase seguindo a adição de substrato de luciferina. A forte redução na infecção de célula TZM-bl foi observada em concentrações de anticorpo que se correlacionaram bem com os valores da IC_{50} e IC_{90} previamente estabelecidos para todos os quatro anticorpos testados contra esta cepa (Fig. 4A-D).

Exemplo 4

Expressão *in vivo* de transgene de anticorpos

[00203]Os vírus AAV recombinantes com o capsídeo de sorotipo 8 que expressaram luciferase ou anticorpo neutralizante de HIV de 4E10 conduzidos de promotores de citomegalovírus (CMV) foram administrados aos camundongos através de uma injeção unitária do músculo gastrocnêmio. As imagens de Xenogen de um camundongo Rag2/γc representativo de 15 semanas após a injeção intramuscular de $1x10^{10}$ de cópias de genoma de luciferase que expressa AAV2/8 são mostradas na (Fig. 5A). Dentro de uma semana da administração, a expressão do gene de luciferase ou anticorpo foi detectável (Figs. 5B e 5C, respectivamente). A expressão continuou a subir, alcançando níveis máximos depois de 12 a 16 semanas e depois diminuindo de duas a três vezes antes de estabilizar durante a duração do estudo de 64 semanas. As Figuras 5B-C mostram que a produção de anticorpo é dose-dependente e é mantida durante pelo menos 64 semanas.

[00204]As regiões variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo b12 neutralizante de HIV foram clonadas no vetor transferidor de AAV, e estoque de AAV recombinante foi produzido para administração intramuscular de $1x10^{11}$ de cópias de genoma no músculo gastrocnêmio de cepas de camundongo (duas imunodeficientes e duas imunocompetentes): NOD/SCID/γc (NSG), Rag2/γc (RAG), C57BL/6 (B6) e Balb/C. Os camundongos produziram o anticorpo codificado em concentrações de

soro que foram 100 vezes mais altas do que os níveis obtidos com o vetor não otimizado, e este nível de expressão persistiu durante pelo menos 52 semanas (Fig. 6 comparada com as Figs. 5C). Os anticorpos de camundongo muito limitados foram elevados contra b12-IgG humana em camundongos B6, considerando que animais Balb/C geraram anticorpos de camundongo detectáveis contra o transgene que não aparece afetar os níveis de IgG humana.

Exemplo 5

Prevenção de perda de células CD4 causadas pela inoculação de HIV

[00205]Os camundongos humanizados HuPBMC-NSG exibem depleção de célula CD4 após à inoculação com HIV de replicação competente (20 ng p24 NL4-3, n = 4, Fig. 7). Este modelo de camundongo foi usado para testar a capacidade dos vetores descritos neste relatório para proteger os camundongos da inoculação *in vivo*.

[00206]Os vírus AAV recombinantes que expressam anticorpo de luciferase ou b12 foram administrados em camundongos NSG, produzindo concentrações de anticorpo b12 de soro estável de aproximadamente 100 μg ml^{-1} dentro de 6 semanas (Fig. 8A). Estes camundongos foram adotivamente povoados com células mononucleares do sangue periférico humano expandidas (huPBMCs), enxertadas durante um período de 2 semanas. Os camundongos depois foram inoculados através de injeção intraperitoneal da cepa de NL4-3 de HIV.

[00207]Após a inoculação de HIV, a maior parte dos camundongos que expressam luciferase mostrou perda dramática de células CD4 considerando que os camundongos que expressam anticorpo b12 mostraram nenhuma depleção de célula CD4 (Fig. 8B).

[00208]Este exemplo demonstra que o vírus AAV recombinante que expressa um anticorpo anti-HIV pode proteger camundongos de perda de célula CD4 causada por infecção por HIV.

Exemplo 6

Proteção usando vários anticorpos neutralizantes de HIV

[00209]Para comparar as habilidades protetoras de vários anticorpos de HIV amplamente neutralizantes, vírus AAV recombinantes que expressam b12, 2G12, 4E10 e 2F5 foram produzidos e administrados em camundongos NSG, respectivamente. Sete semanas após à administração, os camundongos NSG produziram 20 a 250 μg ml^{-1} dos anticorpos indicados (Fig. 9A). As concentrações de soro *in vivo* de cada um dos anticorpos de HIV foram medidos. Os resultados são mostrados na (Fig. 3A).

[00210]Os camundongos transduzidos foram adotivamente povoados com huPBMCs, inoculados por injeção intravenosa com HIV e experimentados semanalmente para quantificar depleção de célula CD4 com o passar do tempo (Fig. 9B). Conforme mostrado na Fig 9B, animais que expressam b12 foram completamente protegidos de infecção, e aqueles que expressam 2G12, 4E10 e 2F5 foram parcialmente protegidos. Os grupos demonstraram proteção parcial consistida de animais com depleção de célula CD4 retardada assim como animais que mantinham níveis altos de célula CD4 por todo o curso do experimento.

[00211]Oito semanas após a inoculação, os camundongos foram sacrificados e seções de baço embutidas em parafina passaram por tingimento imuno-histoquímico para o antígeno p24 expressado por HIV para quantificar a extensão da infecção (Fig. 9C). Conforme mostrado na Fig. 9D, os camundongos que expressam b12 não tiveram células que expressam p24 detectáveis.

Exemplo 7

Determinação da robustez de proteção anti-HIV

[00212]Um grande grupo de camundongos que expressam anticorpo b12 foi adotivamente povoado com huPBMCs. Antes da inoculação, todos os camundongos expressaram altos níveis de IgG humana, presumivelmente devido às células B humanas enxertadas (Fig. 10A), porém apenas aquelas que receberam a IgG

específica produzida pelo vetor que expressa b12 para gp120, que atingiu 100 µg ml^{-1} (Fig. 10B).

[00213]Os camundongos não infectados que expressam luciferase ou b12 demonstraram enxerto de célula CD4 de alto-nível compatível por todo o curso do experimento, mostrando que a toxicidade de transgene não contribuiu à perda de célula CD4 (Fig. 11). Ao contrário, os camundongos que expressam luciferase que receberam 1 ng de depleção de célula CD4 rápida e extensiva experimentada de HIV. Em doses mais altas, a infecção em camundongos que expressam luciferase torna-se mais compatível e resultou em depleção de células CD4 abaixo do nível de detecção em alguns casos (25, 125 ng doses). Notavelmente, todos os camundongos que expressam b12 demonstraram proteção de perda de célula CD4, apesar de receberem doses de HIV em 100 vezes mais altas do que necessário para esgotar sete dos oito animais controle (Fig. 11).

[00214]Este exemplo mostra que o vírus AAV recombinante, divulgado neste relatório, pode ser usado para fornecer imunoprofilaxia eficaz e robusta contra infecção por HIV.

Exemplo 8

Expressão de anticorpo anti-HIV de b12

[00215]A Fig. 12A é um lote que apresenta a expressão de b12 com o passar do tempo como uma função de dose conforme determinado por ELISA da IgG humana total em amostras de soro tomadas após à administração de AAV (n = 8). Os camundongos que receberam vetor que expressa luciferase exibiram nenhum anticorpo humano detectável (n = 12). A Fig. 12B mostra a concentração de b12 em soro um dia antes da inoculação, 3 semanas após a transferência adotiva de PBMCs humanas e 15 semanas após à administração intramuscular da dose indicada de AAV conforme determinado por um ELISA específico para gp120 para medir a fração de anticorpos capazes de se ligar ao HIV (n = 8 - 12). A Fig. 12C mostra depleção de

célula CD4 em camundongos humanizados HuPBMC-NSG como um resultado da inoculação intravenosa com 10 ng de NL4-3 em animais que expressam uma faixa de b12 demonstrando a dose mínima de anticorpo necessária para proteger contra infecção. As Figs 12A e C mostram erro médio e padrão, lote b mostra animais individuais e média (n = 8 - 12).

Exemplo 9

Comparação de b12 e anticorpos de VRC01 em proteção anti-HIV

[00216]Nestes exemplos, o anticorpo de b12 foi comparado com anticorpo de VRC01, um anticorpo anti-HIV neutralizou em 90% de cepas de HIV circulantes *in vitro*. Doses decrescentes de vetor que expressa b12 ou VRC01 foram administradas aos camundongos NSG, e expressão dos anticorpos com o passar do tempo foi monitorada.

[00217]Para ambos os anticorpos, a expressão de dose-dependente foi observada em todos os pontos no tempo analisados (Fig. 12A e Fig. 13A). Os camundongos que expressam luciferase ou anticorpos em vários níveis foram adotivamente povoados com huPBMCs. Exatamente antes da inoculação, um ensaio imunossorvente ligado por enzimas específico para gp120 (ELISA) confirmou a concentração de anticorpo eficaz em cada grupo (Fig. 12B e Fig. 13B). Após à inoculação intravenosa com 10 ng de HIV, células CD4 foram monitoradas para determinar o impacto de concentração de anticorpo. Uma concentração de b12 média de 34 μg ml^{-1} e concentração de VRC01 de 8,3 μg ml^{-1} protegeu os camundongos da infecção (Fig. 12C e Fig. 13C). Os grupos que expressam concentrações mais baixas de b12 e VRC01 foram parcialmente protegidos, com vários animais mostrando nenhuma perda detectável de células CD4 e outros exibindo depleção de célula CD4 atrasada.

Exemplo 10

Proteção de infecção de gripe

[00218]Neste exemplo, o vetor de AAV divulgado neste relatório foi usado para produzir vírus AAV recombinantes que expressam anticorpos antigripe, e os vírus AAV recombinantes foram eficazes na proteção de camundongos a partir da infecção por vírus de gripe.

Materiais e métodos experimentais

Produção e quantificação do vírus da gripe

[00219]Todos os vírus da gripe usados para as infecções em camundongos neste exemplo derivaram seus seis genes internos (PB2, PB1, PA, NP, M, e NS) da cepa A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1). Os genes HA e NA foram derivados das três cepas seguintes e forneceram as abreviações de nome seguintes:

(1) PR8: o HA e NA derivaram de A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), uma cepa adaptada em laboratório amplamente usada.

(2) CA/09: o HA e NA derivaram de A/California/07/2009 (H1N1), uma cepa isolada precocemente durante a emergência em seres humanos da doença pandêmica por H1N1de origem suína em 2009.

(3) SI/06: o HA e NA derivaram de A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1), uma cepa da vacina contra H1N1 sazonal humana.

[00220]Os vírus da gripe foram gerados usando o sistema genético reverso bidirecional de 8 plasmídeos. Brevemente, células 293T e MDCK foram mantidas em DMEM (Mediatech) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Omega Scientific), 100 IU/mL de penicilina (Mediatech), 100 µg/mL de estreptomicina (Mediatech), e 1 % de L-glutamina (Mediatech). Placas de cultura tecidual de 6 reservatórios (Corning) contendo co-culturas de células 293T e MDCK foram co-transfectadas com 250 ng de cada um dos 8 plasmídeos. Em 14 horas após a transfecção, os meios foram aspirados, as células foram lavadas uma vez com PBS, e meio de crescimento da gripe mais 3 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (Sigma-Aldrich) foram adicionados às células. O meio de crescimento da gripe consiste em Opti-MEM I (Invitrogen) com

0,01% de soro bovino fetal, 0,3% de albumina sérica bovina (Invitrogen), 100 IU/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina, e 100 μg/mL de cloreto de cálcio. Depois de 72 horas, o sobrenadante foi coletado e passado para placas de 15 cm (Corning) contendo células MDCK quase confluentes em meio de crescimento da gripe mais 3 μg/mL de tripsina. Depois de 72 horas, o sobrenadante viral foi colhido e centrifugado a 2.000xg por 5 minutos. O sobrenadante viral foi removido e aliquotado, e as alíquotas foram congeladas a -80°C.

Ensaios de plaquetas

[00221]Os vírus da gripe foram quantificados por ensaios de plaquetas em células MDCK usando um revestimento de celulose microcristalina Avicel. Brevemente, as células MDCK foram semeadas em placas de cultura tecidual de 6 reservatórios. Quando as células foram 95% confluentes, os meios foram removidos e diluições seriais de 10 vezes de inóculo viral foram adicionadas a um volume final de 1 mL de meio de crescimento da gripe. Depois de 40 minutos, o inóculo foi removido por aspiração e substituído por 4 ml de meios de crescimento da gripe com 2,4% de celulose microcristalina Avicel e 3 μg/ml de tripsina tratada com TPCK. As placas foram cultivadas inalteradas por 3 dias a 37°C. O revestimento depois foi removido por aspiração, a camada de célula foi lavada duas vezes com PBS, e as células foram tingida com 0,1% de violeta cristal em 20% de etanol por 15 minutos. A solução de tingimento depois foi removida por aspiração, as células foram lavadas novamente com PBS, e as plaquetas foram contadas visualmente para determinar o título viral em termos de unidades de formação de plaqueta (PFU).

Cepas de camundongos

[00222]Camundongos imunocompetentes BALB/cJ (BALB/c) e imunodeficientes NOD/SCID/$\gamma^{-/-}$(NSG) de aproximadamente 4 a 5 semanas de idade foram obtidos da Jackson Laboratory (JAX). Para experimentos envolvendo camundongos velhos, estes animais foram criados e alojados sob condições de

barreira durante o período de tempo antes da inoculação da gripe.

Clonagem de anticorpos neutralizantes da gripe em vetor de AAV

[00223]Sequências correspondendo às regiões variáveis de cadeia pesada e leve de vários anticorpos da gripe foram sintetizadas (Integrated DNA Technologies) e clonadas em um vetor de transferência de AAV contendo a estrutura de região constante de IgG1. Em alguns exemplos, o gene de anticorpo foi otimizado para melhorar a produção de anticorpo *in vivo*.

Produção e administração de AAV aos camundongos

[00224]A produção e injeção intramuscular de AAV foram realizadas de acordo com o procedimento descrito como segue. Brevemente, 1,2 x 10^8 células 293T foram transfectadas com 80 µg do vetor que codifica o anticorpo de interesse, pHELP (Applied Viromics), e pAAV 2/8 SEED (University of Pennsylvania Vector Core) em uma razão de 0,25:1:2. O sobrenadante foi coletado 5 vezes durante o curso de 120 horas. O vírus foi purificado por precipitação de PEG e fracionamento com cloreto de césio antes de ser diafiltrado, concentrado, e o tampão trocado através de filtros de centrífuga de 100k MWCO (Millipore) em tampão consistindo em 100 mM de citrato de sódio e 10 mM de Tris no pH 8 antes de aliquotar e armazenar a -80°C. Para quantificar as alíquotas, o vírus foi descongelado, tratado com DNAse, e titulado por qPCR como previamente descrito (13). Brevemente, o título viral foi determinado por PCR quantitativa usando uma curva padrão gerada de AAV2/8, previamente titulado, purificado que codifica o anticorpo 4E10. A infectividade de alíquotas de vírus foi confirmada *in vitro* por transdução de células 293T e quantificação da concentração do anticorpo no sobrenadante celular por ELISA.

Transdução de AAV de camundongos e quantificação da expressão do gene

[00225]Antes da injeção intramuscular, vírus AAV recombinantes foram descongelados e diluídos à dose indicada com tampão (100 mM de citrato de sódio, 10 mM de Tris no pH 8) em um volume de 40 µL. Os camundongos foram

anestesiados por inalação de isoflurano, e os vírus foram administrados como uma injeção unitária de 40 µL no músculo gastrocnêmio.

[00226]O imageamento bioluminescente foi realizado usando um instrumento IVIS 200 essencialmente como previamente descrito com as modificações seguintes: Imagens bioluminescentes foram tiradas 10 minutos depois da injeção intraperitoneal de 1,5 mg de D-luciferina (Gold Biotechnology). A concentração de IgG humana no soro do camundongo foi determinada realizando-se ELISAs usando uma curva padrão gerada a partir de IgG/Capa Humana purificada (Bethil).

Inoculação dos camundongos com gripe

[00227]Os vírus da gripe foram descongelados e diluídos em PBS para liberar a dose indicada em um volume de 20 µL. Antes da inoculação, os camundongos foram pesados e anestesiados por injeção intraperitoneal de 200 µL de um coquetel contendo 2 mg de cetamina e 0,2 mg de xilazina diluída em PBS. Os camundongos foram inoculados com gripe por inoculação intranasal com 20 µL de vírus diluído, 10 µL por narina. Camundongos infectados foram pesados ao mesmo tempo todo dia.

Produção e quantificação do vírus da gripe GFP

[00228]Vírus da gripe de PB1flank-GFP foram gerados em que GFP é empacotada no segmento PB1 de acordo com os métodos descritos em Bloom *et al*. Science 328:1272 (2010). Vírus de PB1flank-GFP foram cultivados e avaliados em células 293T-CMV-PB1 e MDCK-SIAT1-CMV-PB1 que forneceram a proteína PB1 ausente em trans, conforme descrito em Bloom *et al*. Vírus de PB1flank-GFP foram gerados usando o sistema genético reverso bidirecional de 8 plasmídeos, mas com o plasmídeo de PB1 padrão substituído por pHH-PB1flank-eGFP. Para estes vírus, os outros cinco genes internos (PB2, PA, NP, M, e NS) foram derivados da cepa PR8 como para os vírus usados nas infecções em camundongos. Além dos vírus com o HA e NA de PR8, CA/09, e SI/06, dois vírus adicionais foram usados nestes ensaios:

(1) JP/57: o HA e NA derivaram de A/Japan/305/1957 (H2N2), uma cepa inicial

da doença pandêmica da gripe asiática.

(2) Viet/04: o HA da A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), uma cepa da gripe aviária altamente patogênica. O NA para este vírus foi derivado da cepa A/WSN/1933 (H1N1) adaptada em laboratório. O sítio de clivagem polibásico foi removido do HA.

[00229]Vírus PB1flank-GFP foram quantificados por citometria de fluxo. Células MDCK-SIAT1-CMV-PB1 foram semeadas em placas de 12 reservatórios (Corning) em 105 células por reservatório em 1 mL de meio de crescimento da gripe. 8 horas depois da semeadura, os vírus foram diluídos 1:10, 1:100, e 1:1000 nos meios. Os reservatórios foram infectados com 50 µL de cada uma destas diluições. Células foram colhidas 16,5 h após a infecção por incubação com 250 uL de tripsina-EDTA (Invitrogen) por cinco minutos, remoção de tripsina por aspiração, e re-suspensão em 250 µL de PBS suplementado com 2% de soro bovino fetal e 2 µg/mL de iodeto de propídio (Invitrogen). As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Beckton-Dickinson), e amostras com uma porcentagem de células GFP-positivas entre 0,3 e 3% foram usadas para quantificar o título viral. O título foi calculado da porcentagem de células GFP-positivas, do fator de diluição, e da contagem total de 10^5 células por reservatório.

Ensaios de neutralização

[00230]Ensaios de neutralização foram realizadas usando vírus da gripe PB1flank-GFP e células MDCK-SIAT1-CMV-PB1. 40 µL de meio de crescimento da gripe foram adicionados a todos os reservatórios de uma placa de cultura de tecido de 96 reservatórios de fundo plano (Corning), exceto para a Fileira A, que recebeu 57 µL de meios. Amostras de soros de camundongo foram serialmente diluídas adicionando-se 3 µL de soro aos 57 µL de meio de crescimento da gripe na Fileira A, depois realizando 1:3 diluições seriais até a Fileira G, resultando em uma diluição inicial de 1:20 e diluição final de 1: 4,374 x 10^4. 2 x 10^4 partículas infecciosas de vírus PB1flank-GFP (como determinado por titulação por citometria de fluxo) foram

adicionados às amostras em um volume de 20 µL de meio de crescimento da gripe. As misturas de soro diluído e vírus foram incubadas por 1 h em uma incubadora de CO2 a 5% a 37°C. Depois da incubação, $2x10^4$ células MDCK-SIAT1-CMV-PB1 em um volume de 20 µL de meio de crescimento da gripe foram adicionadas a todos os reservatórios para um MOI de 1. Um controle de célula única, que recebeu soro de camundongo BALB/c ingênuo e nenhum vírus, e um controle de vírus, que recebeu soro de camundongo BALB/c ingênuo, foram incluídos para cada vírus. Placas foram incubadas em uma incubadora de CO_2 a 5% a 37°C por 18 horas. Após a incubação, 40 µL de 1,5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em PBS foram adicionados a cada reservatório para fornecer uma concentração final de 0,5% de Triton X-100, e placas foram incubadas na temperatura ambiente por 5 minutos. 100 µL de cada amostra foram transferidos em placas de 96 reservatórios opacas (Corning) para leitura. A fluorescência de GFP foi quantificada usando um leitor de placa Safire2 (Tecan) configurado para ler do topo com uma excitação de 485 nm, emissão de 515 nm, larguras de fenda de 12 nm tanto para excitação quanto emissão, ganho ajustado para “ideal,” um tempo de integração de 500 µs, e 5 leituras por reservatório. A fluorescência de base do controle de célula única foi subtraída de todas as leituras. As amostras foram normalizadas para o controle viral.

Histologia

[00231]Na conclusão dos experimentos de inoculação *in vivo*, os pulmões foram removidos de camundongos e metade deste tecido foi imersa em 10 % de formalina tamponada neutra por 24 horas. A seguir da fixação, os tecidos foram removidos da formalina e colocados em etanol a 70% até o embutimento em parafina padrão e processamento. Seções espessas de quatro mícrons foram depois tiradas, e o tingimento com hematoxilina e eosina (H&E) foi realizado. As lâminas foram examinadas por um patologista (D.S.R.) em um microscópio óptico Olympus BX51, e as imagens foram obtidas usando uma Câmera Digital de Percepção SPOT

(Diagnostic Instruments). A inflamação foi registrada como segue: 0 = nenhuma inflamação a inflamação mínima; 1 = infiltrados ocasionais nos bronquíolos (menos do que 10% de bronquíolos); 2 = infiltrados facilmente identificados nos bronquíolos (10 a 50% de bronquíolos); 3 = infiltrados facilmente identificados nos bronquíolos com infiltrados parenquimatosos e/ou fibrose inicialmente irregular; 4 = > 50% de bronquíolos com infiltrados, OR 10 a 50% de envolvimento do bronquíolo com epitélio necrótico extensivo nos bronquíolos, angionecrose, ou fibrose extensiva. A contagem foi feita em uma forma cega e uma escala ordinal foi considerada para quaisquer testes estatísticos.

Quantificação viral relativa por RT-qPCR

[00232]O tecido pulmonar foi homogeneizado em 100 µL de PBS. 25 µL de homogeneizado foi usado para extração de RNA por intermédio de Reagente de TRIzol (Invitrogen). O RNA purificado foi recolocado em suspensão em água isenta de nuclease, e a concentração do RNA foi normalizada para 150 ng/µL. RT-qPCR em tempo real foi realizada usando Kit de qRT-PCR SYBR Green qScript de etapa única, Rox (Quanta Biosciences) com iniciadores designados contra PR8 M e um controle endógeno consistindo em proteína ribossômica de camundongo L32. M Dianteiro: CAAGCAGCAGAGGCCATGGA (SEQ ID NO: 36), M Reverso: GACCAGCACTGGAGCTAGGA (SEQ ID NO: 37), L32 Dianteiro: AAGCGAAACTGGCGGAAAC (SEQ ID NO: 38), L32 Reverso: TAACCGATGTTGGGCATCAG (SEQ ID NO: 39). As amostras foram tratadas com DNAse usando o Kit de DNAse Turbo (Invitrogen) e conduzidas em triplicata em um Sistema de PCR em Tempo Real ABI 7300 (Life Technologies) com o programa seguinte: 50°C por 10 minutos, 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 55°C por 30 segundos, seguido por uma análise de curva de fusão. Cada amostra foi individualmente normalizada por sinal de L32 para responder pela variação no RNA de entrada.

Expressão do anticorpo anti-gripe *in vivo*

[00233]Vírus AAV recombinantes que expressam anticorpo anti-gripe F10 ou CR6261 de tamanho natural não modificado foram produzidos. Uma injeção intramuscular única de 1×10^{11} cópias de genoma (GC) do vírus AAV recombinante foi administrada no músculo gastrocnêmio de camundongos Balb/c. Amostras de soro foram obtidas semanalmente e IgG humana foi quantificada por ELISA (Fig. 14). A expressão significante do anticorpo b12 acima de 100 μg/mL foi observada. Ao contrário, os anticorpos tanto F10 quanto CR6261 demonstraram aproximadamente 1 μg/mL de expressão em uma semana que se tornou indetectável no ponto no tempo seguinte antes de elevar lentamente para vários microgramas por mL de soro pela semana 7.

[00234]Para melhorar a expressão *in vivo* de anticorpos F10 e CR6251, construções de anticorpo quimérico em que as cadeias leves de cada um dos anticorpos F10 e CR6251 foram substituídas com a cadeia leve de b12. A seguir da transfecção de células 293T, a expressão substancialmente mais alta de ambos os anticorpos foi observada quando pareadas com cadeia leves de b12, indicando que a cadeia leve não nativa melhorou a expressão do anticorpo (Fig. 15A). Para melhorar a expressão das cadeias leves naturais, um conjunto de regiões variáveis de cadeia leve modificadas contendo 5’ e 3’ sequências juncionais derivadas das cadeias leves de anticorpos b12 ou 4E10 foi criado. As regiões variáveis de cadeia leve modificadas usadas são listadas na Fig. 15B. A seguir da transfecção de células 293T, a cadeia leve de F10LO24 contendo sequências de b12 assim como 4E10 exibiu tanto quanto expressão *in vitro* 12 vezes mais alta (Fig. 15C]). Do mesmo modo, a transfecção de construções contendo cadeia leve de CR6261LO13 com sequências de anticorpo b12 exibiu tanto quanto expressão *in vitro* 20 vezes mais alta (Fig. 15D). Estes anticorpos modificados foram testados usando ensaios de neutralização *in vitro*, e os resultados confirmaram que os anticorpos contendo cadeias leves modificadas mantiveram sua

capacidade para neutralizar duas cepas da gripe. À luz da expressão de anticorpo substancialmente melhorada observada para cadeias leves modificadas, todos os experimentos subsequentes foram realizados com as sequências modificadas F10LO24 e CR6261LO13 e referidas como F10 e CR6261 respectivamente. As sequências de variável região completas usadas, incluindo as regiões variáveis de cadeia leve quiméricas, são fornecidas nas SEQ ID NOs: 40 a 43.

[00235]Conforme mostrado na Fig. 16A, uma injeção intramuscular única de 1x1011 cópias de genoma (GC) de AAV em camundongos BALB/c produziu anticorpo detectável dentro de uma semana de injeção. Concentrações de anticorpo transitoriamente diminuíram antes de aumentar durante as 6 a 8 semanas seguintes, atingindo um platô entre 50 e 200 μg/mL que foi mantido pela duração do estudo de 40 semanas.

Ensaios de neutralização *in vitro*

[00236]Para determinar a extensão do potencial de neutralização dos soros de animais tratados com os vírus AAV recombinantes, ensaios de neutralização *in vitro* foram realizados usando virions da gripe repórteres de GFP contendo cinco hemaglutininas diversas de três subtipos de HA diferentes (H1, H2, e H5). Conforme mostrado na Fig. 16B, os soros de camundongos que expressam um anticorpo de controle negativo (b12, um anticorpo contra HIV) não demonstraram nenhuma neutralização apreciável de qualquer uma das cinco cepas testadas. Ao contrário, os soros de animais que recebem vírus AAV recombinantes que expressam F10 ou CR6261 mostraram capacidade significante para neutralizar todas as cinco cepas.

Proteção *in vivo*

[00237]Para determinar a capacidade dos vírus AAV recombinantes para proteger camundongos da infecção por gripe, os vírus recombinantes foram administrados aos animais e deixados cinco semanas para a expressão do anticorpo. Exatamente antes da inoculação da gripe, aproximadamente 100 a 200 μg/mL dos

anticorpos tanto b12 quanto F10 e uma faixa ampla de concentrações de CR6261 variando de 0,1 μg/mL a 100 μg/mL foram observados na circulação dos camundongos (Fig. 17A). A seguir da administração intranasal da cepa CA/09, uma perda dramática de peso foi observada em animais que expressam o anticorpo b12 de controle, mas nenhuma perda apreciável em camundongos que expressam o anticorpo F10 (Fig. 17B). Camundongos que expressam CR6261 demonstraram uma faixa de perda de peso que foi inversamente proporcional à concentração de IgG sérica, sugerindo que uma concentração sérica mínima de aproximadamente 7,5 μg/mL deste anticorpo foi necessária para prevenir a doença de infecção por CA/09.

[00238]Para examinar a capacidade de VIP para proteger contra outras cepas *in vivo*, animais que expressam anticorpo de controle b12 ou F10 foram inoculados com a cepa SI/06 (Fig. 17C). Os camundongos que expressam o anticorpo de controle exibiram perda de peso durante um período de duas semanas. Ao contrário, camundongos que expressam F10 não mostraram nenhum sinal de doença a seguir da inoculação com SI/06.

[00239]Para determinar a capacidade de VIP para proteger animais de uma inoculação da gripe letal, 1000 PFU da cepa PR/8 letal para camundongo foram intranasalmente administrados aos animais. Os camundongos que expressam b12 de controle experienciaram uma perda dramática de peso e atingiram a meta de nosso estudo dentro de 4 dias (Figs. 17D-E). Ao contrário, os camundongos que expressam F10 não mostraram nenhum sinal significante de doença ou perda de peso, demonstrando que os animais tratados com os vírus AAV recombinantes foram protegidos contra pelo menos três cepas da gripe diversas.

[00240]Para determinar o impacto da inoculação de CA/09 e SI/06 sobre a resposta imune endógena em camundongos inoculados com gripe, amostras de soro de tais animais foram analisadas usando ensaios de neutralização. Os soros de camundongos previamente inoculados que expressam o anticorpo b12 de controle

demonstraram atividade de neutralização forte contra a cepa de inoculação, mas nenhuma atividade detectável contra cepas heterólogas (Figs. 17F-G). Ao contrário, os camundongos tratados com vírus AAV recombinantes que expressam F10 ou CR6261 continuaram a demonstrar atividade de neutralização sérica ampla contra todas as cepas testadas. Também, embora a atividade de neutralização sérica contra PR8, VN/04 e JP/57 não fosse diferencialmente afetada pela inoculação de CA/09 ou SI/06, a atividade de neutralização sérica realçada contra a cepa de inoculação foi observada em camundongos tratados com os vírus AAV recombinantes (Comparar as Figs. 17F e 17G). Estes resultados sugerem que a expressão de anticorpos amplamente neutralizantes protegidos contra doença, no entanto ainda levaram em conta a formação de imunidade humoral endógena adicional, ainda mais potente.

[00241]Este exemplo mostra que o vírus AAV recombinante divulgado neste relatório pode ser usado para fornecer imunoprofilaxia eficaz contra infecção causada por vários vírus da gripe.

Exemplo 11

Proteção da infecção por gripe em animais mais velhos e imunocomprometidos

[00242]Vírus AAV recombinantes que expressam as regiões variáveis dos anticorpos amplamente neutralizantes da gripe F10 e CR6261 foram produzidos.

[00243]Camundongos NOD/SCID/$\gamma^{-/-}$(NSG) imunodeficientes são camundongos que carecem completamente de imunidade adaptativa e exibem respostas imunes inatas significantemente prejudicadas. Os vírus AAV recombinantes que expressam anticorpos F10 e CR6261 foram administrados em uma dose normalizada de 5×10^{12} GC por kg aos animais NSG que eram relativamente jovens (14 a 19 semanas de idade) ou de uma idade avançada (46 a 55 semanas de idade). A expressão do gene foi quantificada durante quatro semanas usando imageamento por Xenogen ou ELISA (Figs. 18A e 18B respectivamente). Ambos os grupos de

animais demonstraram níveis acentuadamente similares de expressão do gene em todos os pontos no tempo, sugerindo que a idade não afetou a capacidade para expressão com base em músculo do gene de AAV. Para determinar se a expressão do anticorpo *in vivo* foi suficiente para proteger estes animais imunocomprometidos de inoculação com gripe, 1000 PFU da cepa PR8 letal foram administrados tanto aos grupos jovens quanto velhos de camundongos (Figs. 18C e 18D respectivamente).

[00244]Em ambos os casos, doença e perda de peso foram observadas em camundongos de controle que expressam luciferase, o que resultou na morte de todos os tais animais durante o curso do estudo. Ao contrário, tanto os animais NSG jovens quanto velhos que expressam F10 foram completamente protegidos da perda de peso induzida pela gripe, sugerindo que estas concentrações de anticorpo F10 sozinho foram suficientes para proteger os camundongos na ausência de uma resposta imune endógena. Para caracterizar ainda a extensão à qual F10 foi capaz de prevenir a doença em camundongos NSG, os animais foram sacrificados por todo o período de estudo e o nível de inflamação foi registrado em amostras histológicas de tecido pulmonar. Os camundongos infectados que expressam luciferase demonstraram infiltração luminal substancial dos bronquíolos cinco dias após a infecção (Fig. 18E esquerda). Ao contrário, os animais protegidos por F10 mostraram níveis muito baixos de inflamação e bronquíolos claros compatíveis com um nível substancialmente mais baixo de patologia nestes camundongos (Fig. 18E direita). A contagem da inflamação pulmonar em amostras histológicas com o passar do tempo demonstrou que os animais em pontos no tempo iniciais exibiram a inflamação mais severa (Fig. 18F). Os camundongos que expressam anticorpo F10 exibiram significantemente menos inflamação em todos os pontos no tempo analisados quando comparado com camundongos de controle com luciferase.

[00245]Para quantificar diretamente a capacidade dos vírus AAV recombinantes para controlar a replicação viral, nós determinamos a quantidade de

vírus em camundongos NSG extraindo-se o RNA total do tecido pulmonar colhido no momento do sacrifício e RNA viral medido por RT-PCR quantitativa. Como mostrado na Fig. 18G, os pulmões dos camundongos que expressam luciferase exibiram carga viral alta por todo o curso do experimento. Ao contrário, animais que expressam F10 analisados em pontos no tempo iniciais continham níveis moderados de RNA viral que diminuíram substancialmente com o passar do tempo, como um resultado da replicação viral dramaticamente reduzida na presença de anticorpo F10 apesar da carência de imunidade adaptativa endógena.

Exemplo 12

Proteção da infecção por HIV em camundongos humanizados com medula óssea, fígado e timo (BLT)

[00246]O modelo de camundongo humanizado com medula óssea, fígado e timo (BLT) é um modelo bem estabelecido para a prevenção de infecção por HIV intravaginal. O camundongo humanizado BLT é produzido por implantação cirúrgica de tecidos fetais em receptores NOD/SCID/γC (NSG) imunodeficientes, seguido por enxerto de células-tronco hematopoiéticas. Estas células enxertadas dão origem a um repertório completo de células imunes treinadas no camundongo que podem produzir respostas imunes funcionais a seguir da infecção por HIV. O método de BLT foi descoberto exibir enxerto de célula humana significante de tecidos mucosos incluindo vagina e cólon e foi mostrado suportar a transmissão de HIV a seguir da exposição mucosa ao vírus HIV JR-CSF CCR5-trópico concentrado. Neste exemplo, camundongos BLT foram usados para testar a capacidade dos vírus AAV recombinantes que expressam anticorpos anti-HIV para impedir a transmissão de HIV através de vias mucosas.

[00247]Vírus AAV recombinantes que expressam anticorpo anti-HIV VRC01 ou proteína luciferase foram produzidos de acordo com os métodos divulgados neste relatório. Para testar a eficácia do anticorpo VRC01 para impedir a transmissão de

HIV na superfície mucosa, um coorte de animais BLT foi produzido e os vírus AAV recombinantes que expressam VRC01 foram administrados aos camundongos BLT para gerar animais que expressam anticorpo neutralizante VRC01 em uma concentração sérica de 100 μg/mL ou proteína luciferase como um controle negativo.

[00248]Para moldar a natureza relativamente infrequente de transmissão de HIV na mucosa humana, um regime de inoculação repetitivo de dose baixa de administrações vaginais não abrasivas semanalmente de vírus HIV de JR-CSF não concentrado foi adotado. Uma representação esquemática do regime de inoculação de HIV é mostrada na Figura 19A. Durante um período de 14 semanas, os camundongos foram sangrados e depois inoculados toda semana com 50ng p24 de vírus HIV de JR-CSF por administração vaginal não abrasiva de inóculo. Níveis de célula CD4 foram medidos semanalmente usando citometria de fluxo (Figura 19B). Conforme mostrado na Figura 17B, houve um declínio modesto mas estatisticamente significante no nível de célula CD4+ em animais que expressam luciferase em relação àqueles que produzem VRC01. Depois de 13 semanas de inoculação com HIV vaginal repetitiva, cargas virais plasmáticas de HIV no momento do sacrifício foram medidas por ensaio de qPCR de Carga Viral de HIV-1 em Tempo Real Abbott (o limite de detecção para este ensaio foi 200 cópias/mL). Os resultados são mostrados na Figura 19C, que revelou que embora todos os animais que expressam luciferase se tornaram infectados, apenas dois dos oito camundongos que expressam VRC01 mostraram evidência significante de replicação viral. Estes resultados mostram que os vírus AAV recombinantes que expressam anticorpos anti-HIV podem impedir a transmissão de HIV na mucosa em camundongos BLT.

Exemplo 13

Produção de anticorpos do vírus da hepatite C (HCV) em camundongos FVB

[00249]Este exemplo ilustra que os vírus AAV recombinantes podem ser usados para produzir nível alto de anticorpo de HCV *in vivo*.

[00250]Vetores de AAV compreendendo sequências de codificação para os anticorpos B12, AR3A e AR3B foram construídos. Os vetores de AAV foram usados para produzir vírus AAV recombinantes que expressam anticorpos B12, AR3A e AR3B, respectivamente. Os vírus AAV recombinantes foram administrados aos camundongos FVB. Níveis de expressão níveis do anticorpo correspondente no soro do animal foram medidos semanalmente. Os resultados são mostrados na Figura 20. Conforme mostrado na Figura 20, níveis significantes de anticorpos de HCV foram produzidos no animal.

Exemplo 14

Prevenção da infecção por HIV

[00251]Este exemplo ilustra a imunoprofilaxia de um paciente em risco de desenvolver infecção por HIV.

[00252]Um AAV recombinante é produzido usando um vetor de transferência de AAV compreendendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo neutralizante anti-HIV. Qualquer anticorpo neutralizante anti-HIV conhecido pode ser usado, incluindo mas não limitado a, anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, e qualquer variante destes. Por exemplo, um vetor de transferência de AAV tendo o promotor de CASI, sequências de codificação para um anticorpo neutralizante anti-HIV, sequência WPRE e SV40 poli(A) pode ser usado. Exemplos de tais vetores de transferência de AAV incluem os vetores fornecidos nas SEQ ID NOs: 17 a 21 e 24. Um paciente é identificado como estando em risco de desenvolver infecção por HIV e sendo administrado com uma quantidade eficaz do AAV recombinante. O AAV recombinante é administrado ao paciente por injeção intramuscular. O AAV recombinante expressa o anticorpo anti-HIV no paciente, desse modo reduzindo o risco para o paciente desenvolver infecção por HIV. A carga viral de HIV no paciente pode ser determinada em vários pontos no tempo depois que o paciente é administrado com o AAV recombinante. A dosagem

apropriada (isto é, o nível de expressão do anticorpo anti-HIV) e regime de tratamento pode ser facilmente determinada por técnicos habilitados com base em vários fatores incluindo, mas não limitados, à via de administração e à extensão da exposição ao HIV pelo paciente. A eficácia da imunoprofilaxia é avaliada observando-se reduzir o risco de infecção por HIV quando comparado aos pacientes que não recebem nenhum tratamento para AAV.

Exemplo 15

Tratamento de câncer de cólon

[00253]Este exemplo ilustra o tratamento de um paciente que sofre de ou em risco de desenvolver câncer de cólon.

[00254]Um AAV recombinante é produzido usando um vetor de transferência de AAV compreendendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo IMC-C225 (Cetuximab®, um anticorpo do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR)). Por exemplo, sequências de codificação para anticorpo IMC-C225 podem ser inseridas em um vetor de transferência de AAV tendo o promotor de CASI, sequência de WPRE e SV40 poli(A). Um paciente que sofre de ou em risco de desenvolver câncer de cólon é identificado e administrado com uma quantidade eficaz do AAV recombinante. O AAV recombinante é administrado ao paciente por injeção intramuscular. O AAV recombinante expressa o anticorpo IMC-C225 no paciente, desse modo inibindo a progressão do câncer no paciente. A dosagem apropriada (isto é, o nível de expressão de anticorpo IMC-C225) e regime de tratamento podem ser facilmente determinados por técnicos habilitados com base em vários fatores incluindo, mas não limitados, à via de administração e ao estado da doença do paciente. A eficácia do tratamento é avaliada observando-se o retardo ou redução da progressão da doença, melhora ou paliação do estado da doença, e remissão.

Exemplo 16

Prevenção da infecção por HCV

[00255]Este exemplo ilustra a imunoprofilaxia de um paciente em risco de desenvolver infecção por HCV.

[00256]Um AAV recombinante é produzido usando um vetor de transferência de AAV compreendendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo neutralizante anti-HCV. Qualquer anticorpo neutralizante anti-HCV conhecido pode ser usado, incluindo mas não limitado a, anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B, anticorpo anti-HCV AR4A, e qualquer variante destes. Por exemplo, um vetor de transferência de AAV tendo o promotor de CASI, sequências de codificação para um anticorpo neutralizante anti-HCV, sequência de WPRE e SV40 poli(A) pode ser usado. Exemplos de tais vetores de transferência de AAV incluem o vetor fornecido na SEQ ID NO: 22, 23 e 28.

[00257]Um paciente é identificado como estando em risco de desenvolver infecção por HCV e administrado com uma quantidade eficaz do AAV recombinante. O AAV recombinante é administrado ao paciente por injeção intramuscular. O AAV recombinante expressa o anticorpo AR3A no paciente, desse modo reduzindo o risco para o paciente desenvolver infecção por HCV. A dosagem apropriada (isto é, o nível de expressão do anticorpo anti-HCV) e regime de tratamento podem ser facilmente determinados por técnicos habilitados com base em vários fatores incluindo, mas não limitados, à via de administração e à extensão da exposição de HCV para o paciente. A carga viral de HCV no paciente pode ser determinada em vários pontos no tempo depois que o paciente é administrado com o AAV recombinante. A eficácia da imunoprofilaxia é avaliada observando-se a redução do risco de infecção por HCV quando comparado aos pacientes que não recebem nenhum tratamento para AAV.

Exemplo 17

Prevenção da infecção por vírus da gripe

[00258]Este exemplo ilustra a imunoprofilaxia de um paciente em risco de desenvolver infecção por vírus da gripe.

[00259]Um AAV recombinante é produzido usando um vetor de transferência de AAV compreendendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo neutralizante anti-gripe. Qualquer anticorpo neutralizante anti-gripe conhecido pode ser usado, incluindo mas não limitado a, anticorpo anti-gripe F10, anticorpo anti-gripe CR6261, anticorpo anti-gripe FI6, anticorpo anti-gripe TCN32, e qualquer variante destes. Por exemplo, um vetor de transferência de AAV tendo o promotor de CASI, sequências de codificação para um anticorpo neutralizante anti-gripe, sequência de WPRE e SV40 poli(A) pode ser usado. Exemplos de tais vetores de transferência de AAV incluem o vetor fornecido na SEQ ID NO: 25 a 27, 29 e 30.

[00260]Um paciente é identificado como estando em risco de desenvolver infecção por gripe e administrado com uma quantidade eficaz do AAV recombinante. O AAV recombinante é administrado ao paciente por injeção intramuscular. O AAV recombinante expressa o anticorpo F10 no paciente, desse modo reduzindo o risco para o paciente desenvolver infecção pelo vírus da gripe. A dosagem apropriada (isto é, o nível de expressão do anticorpo neutralizante antigripe) e regime de tratamento podem ser facilmente determinados por técnicos habilitados com base em vários fatores incluindo, mas não limitados, à via de administração e à extensão da exposição ao vírus da gripe para o paciente. A carga viral da gripe no paciente pode ser determinada em vários pontos no tempo depois que o paciente é administrado com o AAV recombinante. A eficácia da imunoprofilaxia é avaliada observando-se a redução do risco de infecção por gripe quando comparado aos pacientes que não recebem nenhum tratamento de AAV.

[00261]Em pelo menos alguma das modalidades previamente descritas, um ou mais elementos usados em uma modalidade podem permutavelmente ser usados em uma outra modalidade a menos que uma tal substituição não seja tecnicamente possível. Será avaliado por aqueles habilitados na técnica que várias outras omissões, adições e modificações podem ser feitas aos métodos e estruturas descritos acima

sem divergir do escopo do assunto reivindicado. Todas as tais modificações são intencionadas a cair dentro do escopo do assunto, conforme definido pelas reivindicações anexas.

[00262]Com respeito ao uso de substancialmente quaisquer termos no plural e/ou singular, neste relatório, aqueles tendo habilidade na técnica podem interpretar do plural ao singular e/ou do singular ao plural como é apropriado ao contexto e/ou aplicação. As várias permutações no singular/plural podem ser expressamente apresentadas neste relatório por motivo de clareza.

[00263]Será entendido por àqueles dentro da técnica que, em geral, os termos usados neste relatório, e especialmente nas reivindicações anexas (por exemplo, contextos das reivindicações anexas) são geralmente intencionados como termos “abertos” (por exemplo, o termo “incluindo” deve ser interpretado como “incluindo, mas não limitado a,” o termo “tendo” deve ser interpretado como “tendo pelo menos,” o termo “inclui” deve ser interpretado como “inclui, mas não é limitado a,” etc.). Será entendido ainda por aqueles dentro da técnica que se um número específico de uma recitação da reivindicação introduzida for intencionado, tal intenção será explicitamente relatada na reivindicação, e na ausência de tal recitação nenhuma intenção está presente. Por exemplo, como uma ajuda para compreensão, as reivindicações anexas seguintes podem conter o uso das frases introdutórias “pelo menos um” e “um ou mais” para introduzir as recitações da reivindicação. Entretanto, o uso de tais frases não deve ser interpretado para implicar que a introdução de uma recitação da reivindicação pelos artigos indefinidos “um” ou “uma” limita qualquer reivindicação particular contendo tal recitação da reivindicação introduzida às modalidades contendo apenas tal recitação, mesmo quando a mesma reivindicação inclui as frases introdutórias “um ou mais” ou “pelo menos um” e artigos indefinidos tais como “um” ou “uma” (por exemplo, “um” e/ou “uma” devem ser interpretados para significar “pelo menos um” ou “um ou mais”); o mesmo se confirma para o uso de

artigos definidos usados para introduzir recitações da reivindicação. Além disso, mesmo se um número específico de uma recitação da reivindicação introduzida for explicitamente relatado, aqueles habilitados na técnica reconhecerão que tal recitação deve ser interpretada para significar pelo menos o número relatado (por exemplo, a recitação simples de “duas recitações,” sem outros modificadores, significa pelo menos duas recitações, ou duas ou mais recitações). Além disso, nestes exemplos onde uma convenção análoga a “pelo menos um de A, B, e C, etc.” é usada, em geral tal construção é intencionada no sentido de que uma pessoa tendo habilidade na técnica entenderia a convenção (por exemplo, “um sistema tendo pelo menos um de A, B, e C” incluiria mas não seria limitado aos sistemas que têm A sozinho, B sozinho, C sozinho, A e B juntos, A e C juntos, B e C juntos, e/ou A, B, e C juntos, etc.). Nestes exemplos onde uma convenção análoga a “pelo menos um de A, B, ou C, etc.” é usada, em geral uma tal construção é intencionada no sentido de que uma pessoa tendo habilidade na técnica entenderia a convenção (por exemplo, “um sistema tendo pelo menos um de A, B, ou C” incluiria mas não seria limitado aos sistemas que têm A sozinho, B sozinho, C sozinho, A e B juntos, A e C juntos, B e C juntos, e/ou A, B, e C juntos, etc.). Será entendido ainda por aqueles dentro da técnica que virtualmente qualquer palavra e/ou frase disjuntivas apresentando dois ou mais termos alternativos, se na descrição, reivindicações, ou desenhos, deve ser entendido a considerar as possibilidades de incluir um dos termos, qualquer um dos termos, ou ambos os termos. Por exemplo, a frase “A ou B” será entendida a incluir as possibilidades de “A” ou “B” ou “A e B.”

[00264]Além disso, onde características ou aspectos da divulgação são descritos em termos de grupos Markush, aqueles habilitados na técnica reconhecerão que a divulgação também é deste modo descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush.

[00265]Como será entendido por uma pessoa habilitada na técnica, para

quaisquer e todos os propósitos, tal como em termos de fornecer uma descrição por escrito, todas as faixas divulgadas neste relatório também abrangem quaisquer e todas as sub-faixas e combinações possíveis de sub-faixas deste. Qualquer faixa listada pode ser facilmente reconhecida como suficientemente descrevendo e permitindo a mesma faixa sendo quebrada em pelo menos metades, terços, quartos, quintos, décimos iguais, etc. Como um exemplo não limitante, cada faixa debatida neste relatório pode ser facilmente quebrada em um terço inferior, terço intermediário e terço superior, etc. Como também será entendido por uma pessoa habilitada na técnica toda linguagem tal como “até,” “pelo menos,” “maior do que,” “menor do que,” e semelhantes incluem o número relatado e referem-se a faixas que podem ser subsequentemente quebradas em sub-faixas como debatido acima. Finalmente, como será entendido por uma pessoa habilitada na técnica, uma faixa inclui cada membro individual. Assim, por exemplo, um grupo tendo 1 a 3 artigos refere-se aos grupos tendo 1, 2, ou 3 artigos. Similarmente, um grupo tendo 1 a 5 artigos refere-se aos grupos tendo 1, 2, 3, 4, ou 5 artigos, e assim por diante.

[00266]Embora vários aspectos e modalidades tenham sido divulgados neste relatório, outros aspectos e modalidades estarão evidentes àqueles habilitados na técnica. Os vários aspectos e modalidades divulgados neste relatório são para propósitos de ilustração e não são intencionados a serem limitantes, com o escopo e espírito verdadeiros sendo indicados pelas reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Vetor viral **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor é um vetor viral adenoassociado e compreende:

um promotor compreendendo a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1; e

um elemento regulador pós-transcricional selecionado a partir do grupo consistindo em um elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite de marmota (WPRE), um elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite B (HBVPRE), ou um elemento de transporte de RNA (RTE).

2. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende um elemento regulador pós-transcricional do vírus da hepatite de marmota (WPRE) que compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 7.

3. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda um polinucleotídeo ligado de maneira operável com o promotor, em que o polinucleotídeo compreende uma região codificante de uma proteína de interesse.

4. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo compreende uma sequência de peptídeo sinal imediatamente a montante da região codificante da proteína de interesse, em que o peptídeo sinal compreende a sequência de SEQ ID NO: 11 ou SEQ ID NO: 12.

5. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 3 ou 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor compreende uma sequência de consenso de Kozak compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 41 ou SEQ ID NO: 42.

6. Vetor viral, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de interesse é selecionada a partir do grupo que consiste em anticorpos de comprimento total, hormônios de crescimento (GHs), fatores de crescimento tipo insulina (IGFs), G-CSFs, eritropoietinas (EPOs),

insulinas, fragmentos de anticorpo Fab, fragmentos de anticorpo scFV, proteínas de coagulação relacionadas à hemofilia, distrofina, ácido lipase lisossomal, fenilalanina hidroxilase (PAH), enzimas relacionadas à doença de armazenamento de glicogênio, um anticorpo neutralizante de malária e um anticorpo neutralizante de vírus.

7. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo neutralizante de vírus é um anticorpo neutralizante para um vírus da imunodeficiência humana (HIV), um vírus da hepatite C (HCV), ou um vírus da influenza.

8. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo neutralizante para HIV é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, e em que o anticorpo neutralizante para HCV é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B e anticorpo anti-HCV AR4A.

9. Vetor viral, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor compreende um doador de *splice* compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 5, ou um aceitante de *splice* compreendendo a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 6.

10. Vetor viral, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o promotor compreende um íntron compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 8.

11. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo compreende uma primeira região codificante para a região variável de cadeia pesada de uma imunoglobulina e uma segunda região codificante para a região variável de cadeia leve da imunoglobulina.

12. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a primeira região codificante e a segunda região codificante são separadas

por uma sequência F2A compreendendo a sequência de SEQ ID NO: 9 ou SEQ ID NO: 10.

13. Método para produzir um vírus adeno-associado (AAV) recombinante, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

fornecer uma linhagem celular de empacotamento com o vetor viral, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11; e

recuperar um vírus AAV recombinante a partir do sobrenadante da linhagem celular de empacotamento.

14. Polinucleotídeo isolado, sintético ou recombinante **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:1.

15. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo é compreendido dentro de um vetor viral.

16. Uso de um vírus adeno-associado (AAV) recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeos que codifica um anticorpo neutralizante para um vírus, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma infecção viral causada pelo vírus ou para a redução do risco de infecção do vírus, em que o AAV compreende a sequência de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o anticorpo neutralizante é selecionado a partir do grupo que consiste em anticorpo anti-HIV b12, anticorpo anti-HIV 2G12, anticorpo anti-HIV 4E10, anticorpo anti-HIV 2F5, anticorpo anti-HCV AR3A, anticorpo anti-HCV AR3B e anticorpo anti-HCV AR4A.

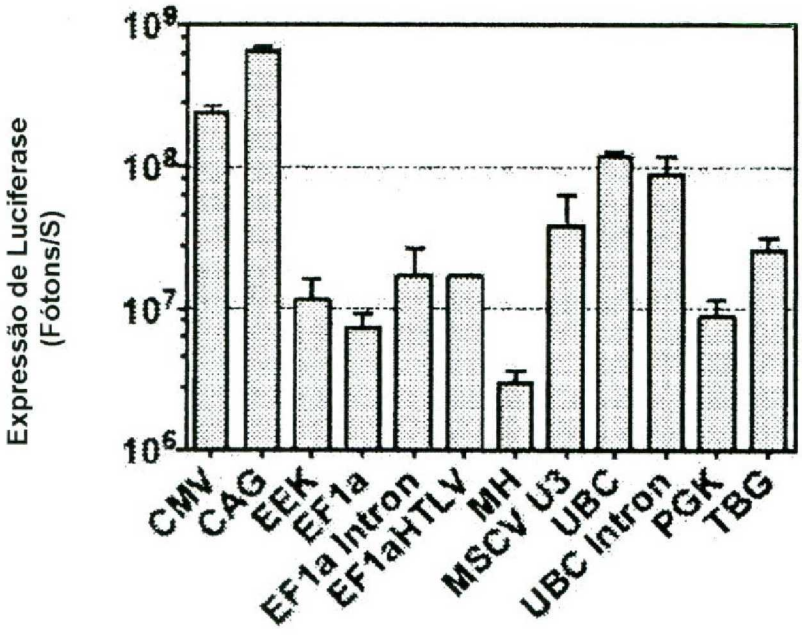
18. Vetor viral, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o vetor viral compreende a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das sequências de SEQ ID NOs: 14 a 30 ou SEQ ID NO: 40.

19. Polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO**

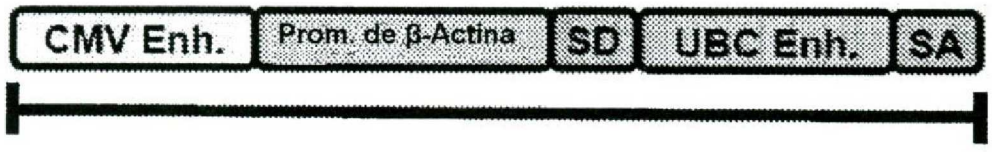
pelo fato de que o vetor viral compreende a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 30 ou SEQ ID NO: 40.

FIG.1

A.



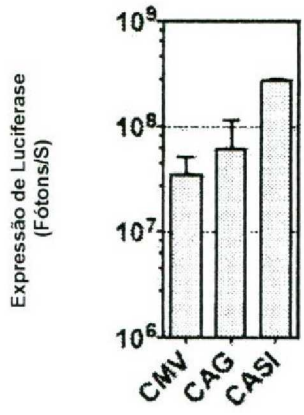
B.



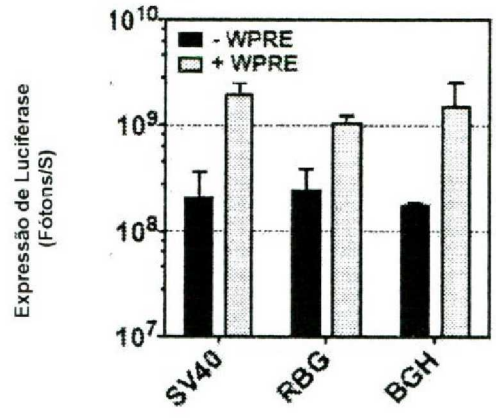
Promotor de CASI - 1,05 kb

FIG.1 (CONTINUAÇÃO)

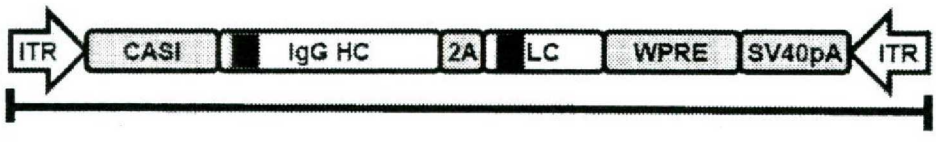
C.



D.



E.



Vetor de Expressão de IgG VIP - 4,5 kb

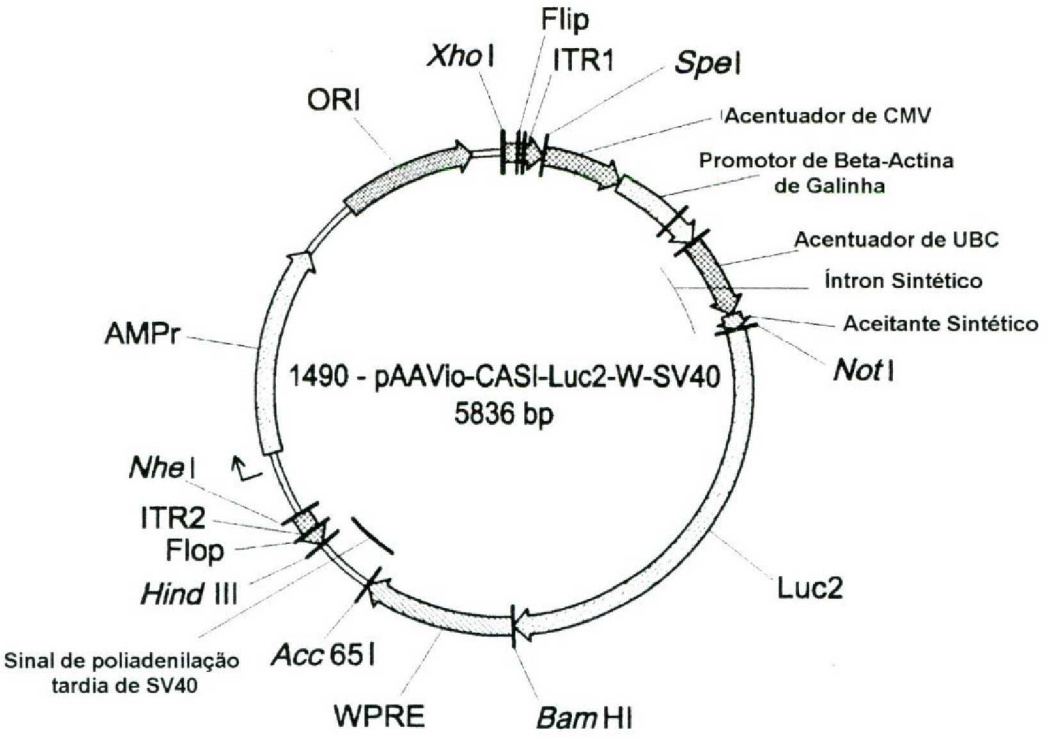
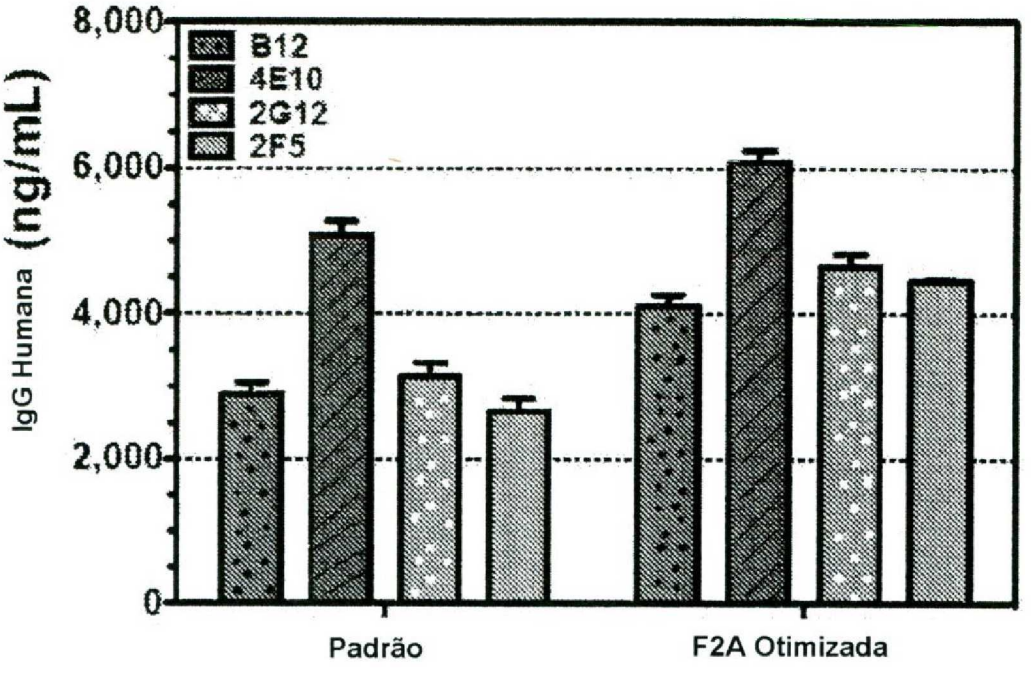

Flip
Xho I
ITR1
Spe I
ORI
Acentuador de CMV
Promotor de Beta-Actina
de Galinha
Acentuador de UBC
Íntron Sintético
Aceitante Sintético
Not I
AMPr
1490 - pAAVio-CASI-Luc2-W-SV40
5836 bp
Nhe I
ITR2
Flop
Hind III
Luc2
Sinal de poliadenilação
tardia de SV40
Acc 65 I
WPRE
Bam HI

FIG. 2

FIG.3

A.


8,000
6,000
4,000
2,000
0
IgG Humana (ng/mL)
B12
4E10
2G12
2F5
Padrão
F2A Otimizada

B.

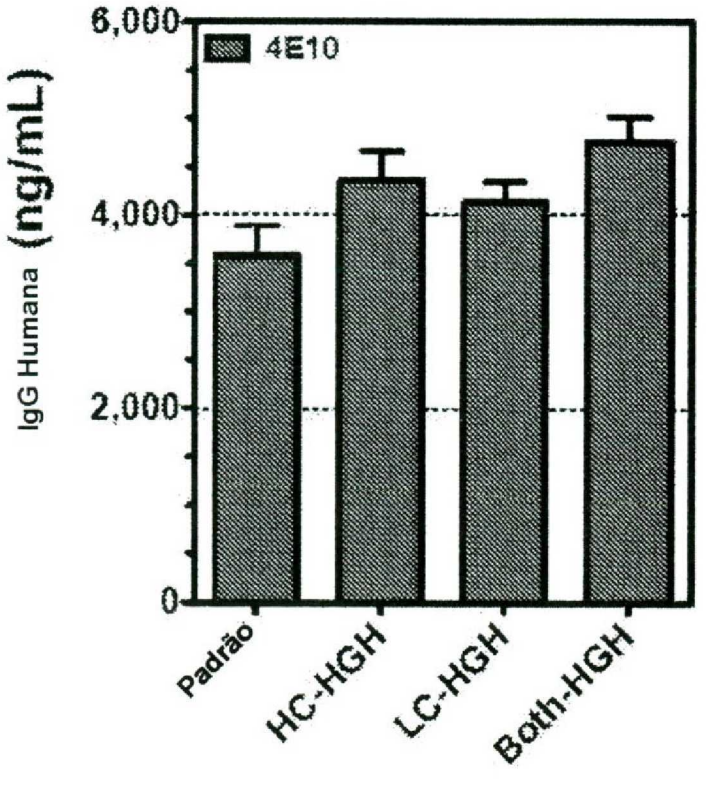
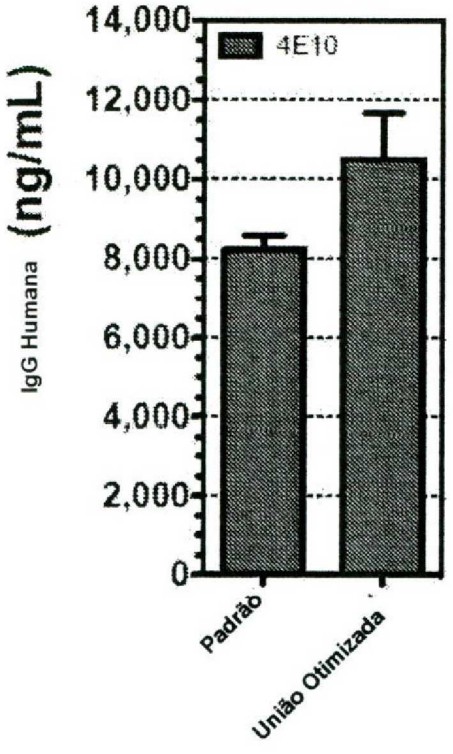

6,000
4,000
2,000
0
IgG Humana (ng/mL)
4E10
Padrão
HC-HGH
LC-HGH
Both-HGH

FIG.3 (CONTINUAÇÃO)

C.



D.

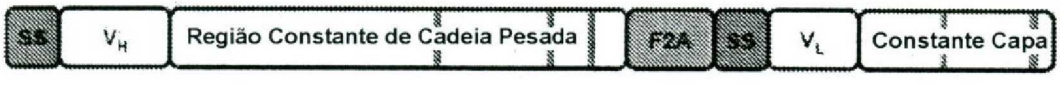
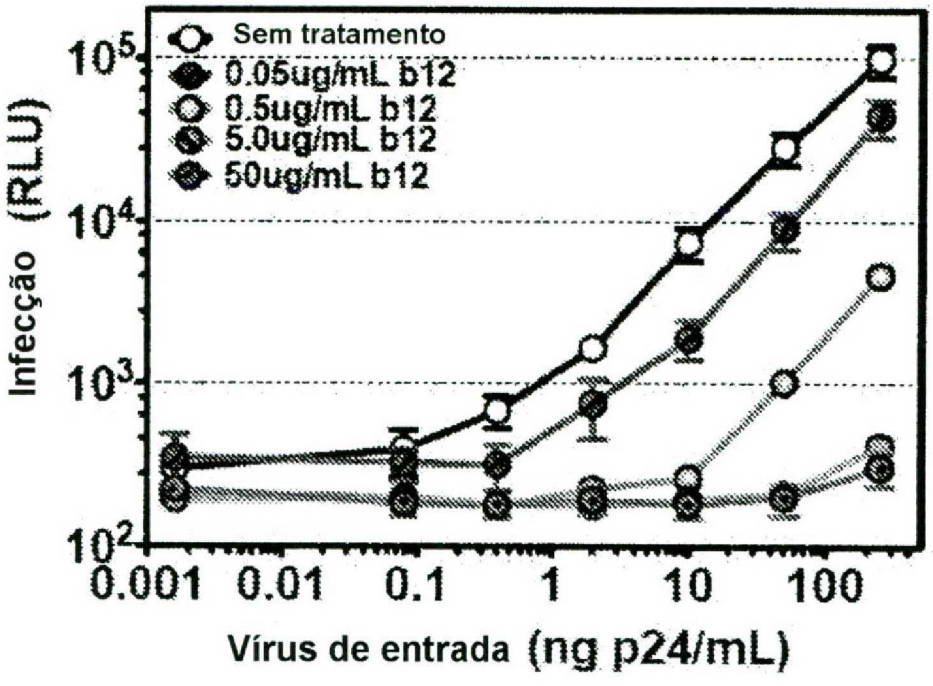


FIG.4

A.


Sem tratamento
0.05ug/mL b12
0.5ug/mL b12
5.0ug/mL b12
50ug/mL b12
Infecção (RLU)
10^5
10^4
10^3
10^2
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Vírus de entrada (ng p24/mL)

B.

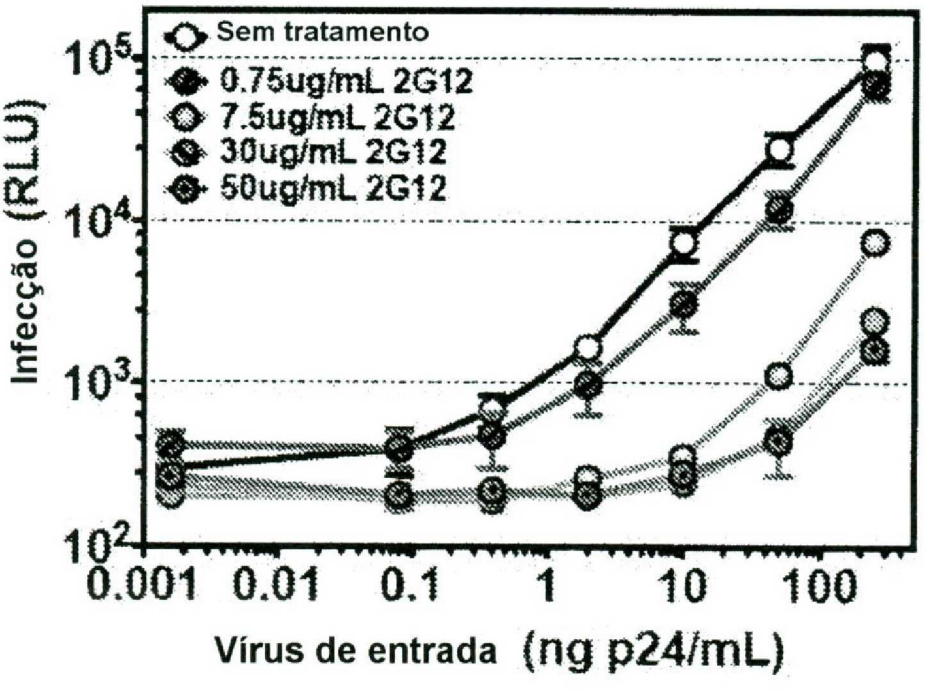
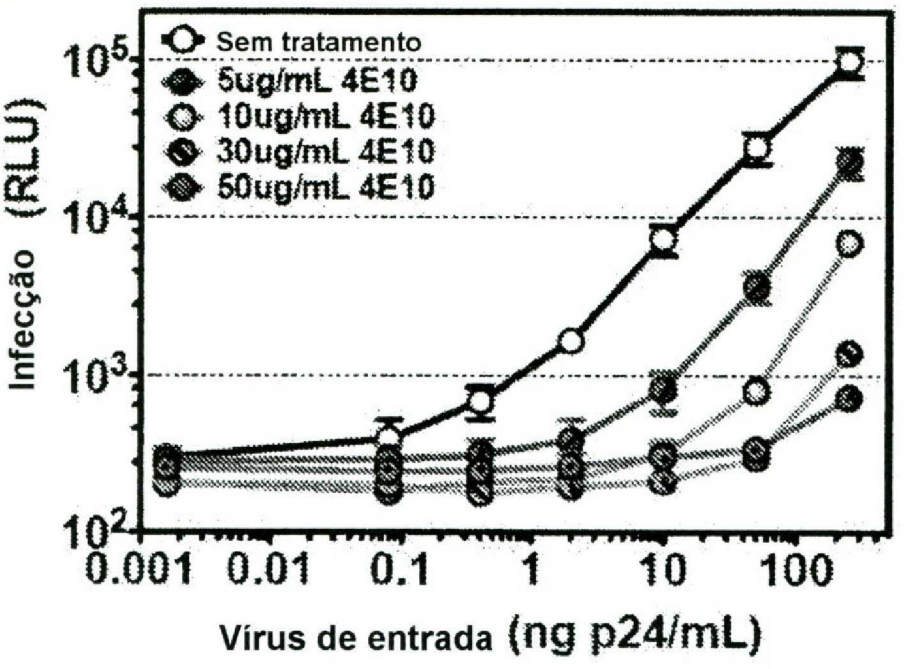

Sem tratamento
0.75ug/mL 2G12
7.5ug/mL 2G12
30ug/mL 2G12
50ug/mL 2G12
Infecção (RLU)
10^5
10^4
10^3
10^2
0.001
0.01
0.1
1
10
100
Vírus de entrada (ng p24/mL)

FIG.4 (CONTINUAÇÃO)

C.



D.

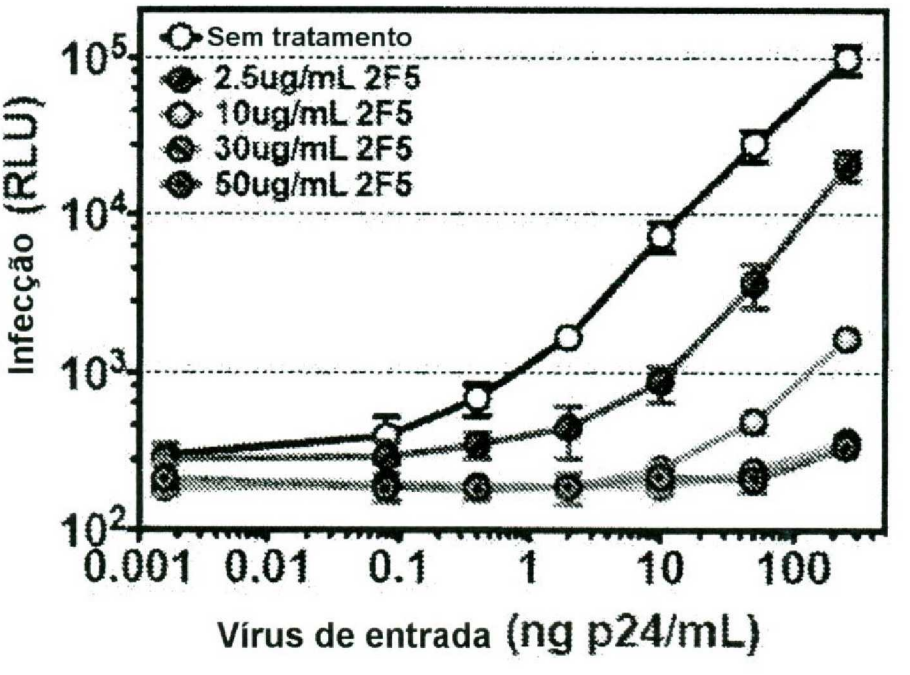
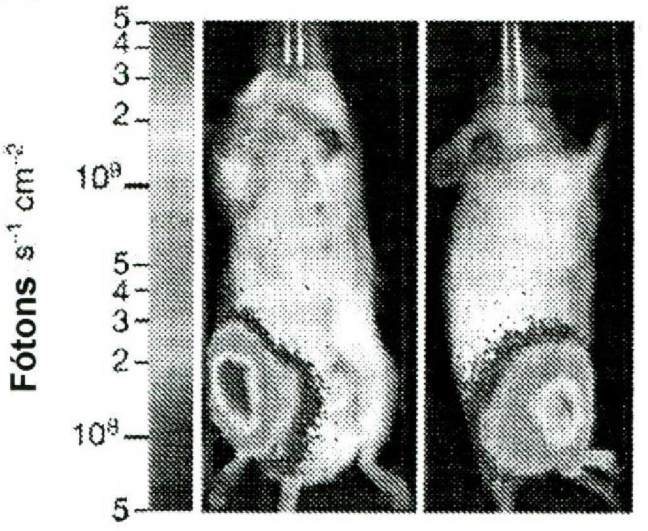
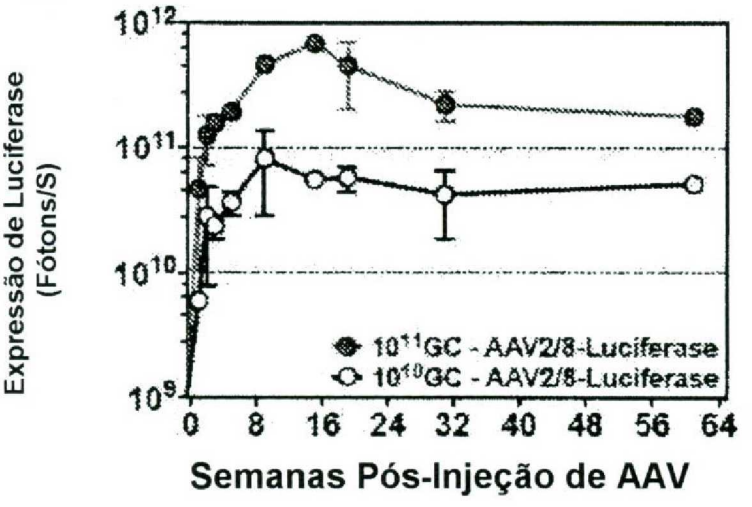


FIG.5

A.


Fótons s⁻¹ cm⁻²
5
4
3
2
10⁸
5
4
3
2
10⁷
5

B.


Expressão de Luciferase (Fótons/S)
10¹²
10¹¹
10¹⁰
10⁹
10¹¹GC - AAV2/8-Luciferase
10¹⁰GC - AAV2/8-Luciferase
0 8 16 24 32 40 48 56 64
Semanas Pós-Injeção de AAV

C.

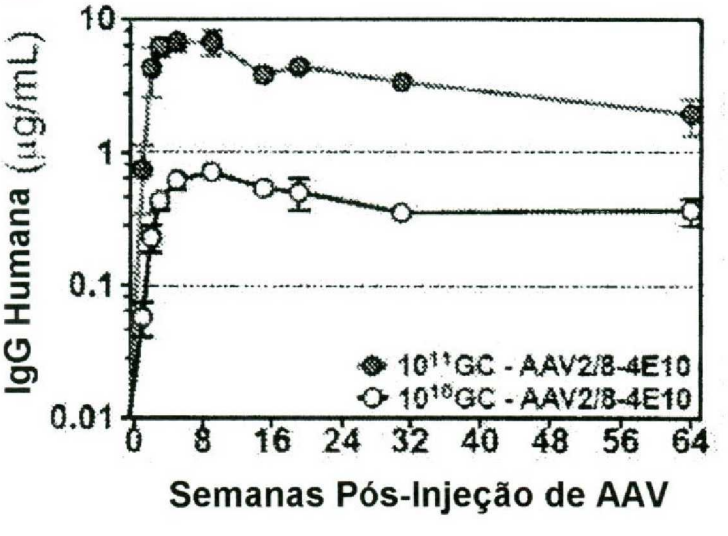

IgG Humana (µg/mL)
10
1
0.1
0.01
10¹¹GC - AAV2/8-4E10
10¹⁰GC - AAV2/8-4E10
0 8 16 24 32 40 48 56 64
Semanas Pós-Injeção de AAV

FIG.6

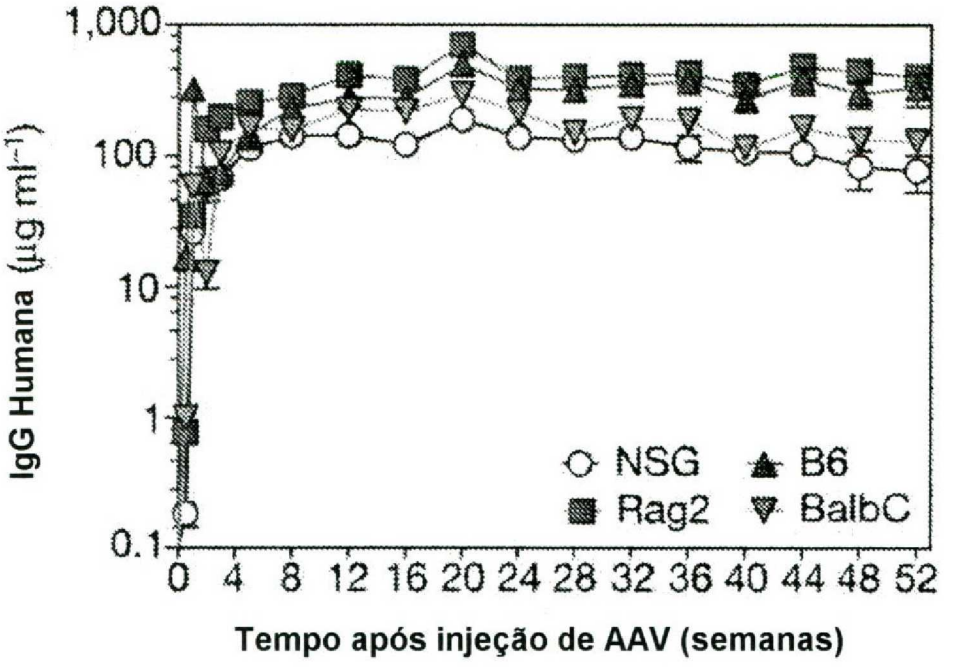

1,000
100
10
1
0.1
IgG Humana (µg ml⁻¹)
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 52
Tempo após injeção de AAV (semanas)
NSG
B6
Rag2
BalbC

FIG.7

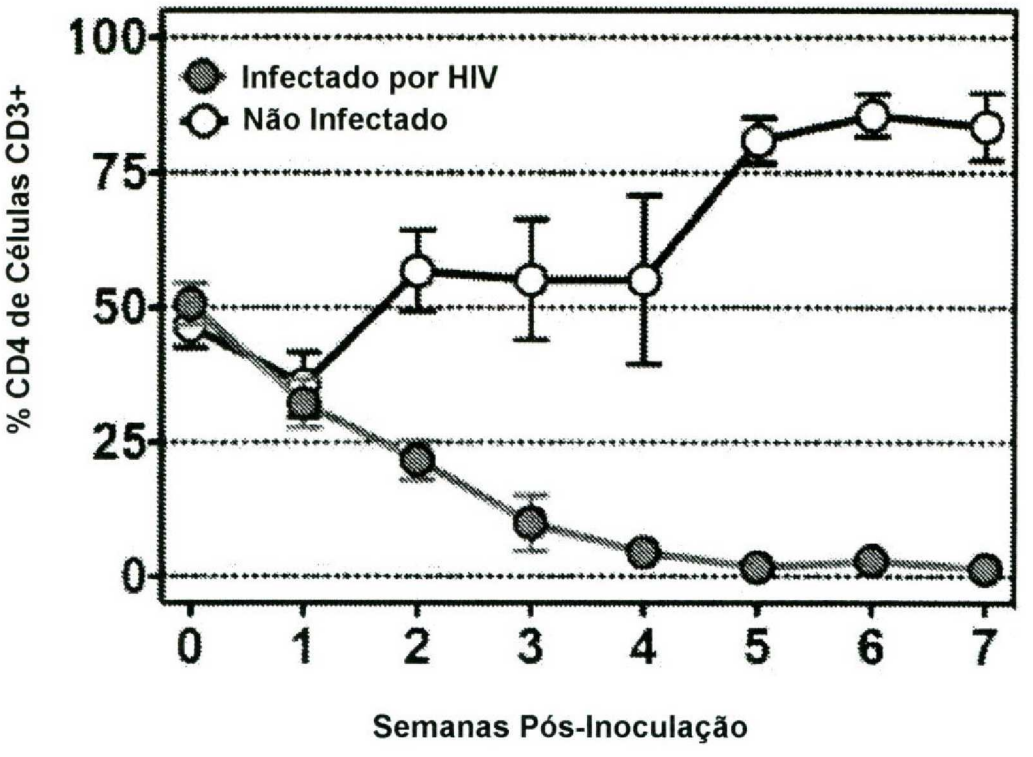

100
75
50
25
0
Infectado por HIV
Não Infectado
% CD4 de Células CD3+
0
1
2
3
4
5
6
7
Semanas Pós-Inoculação

FIG.8

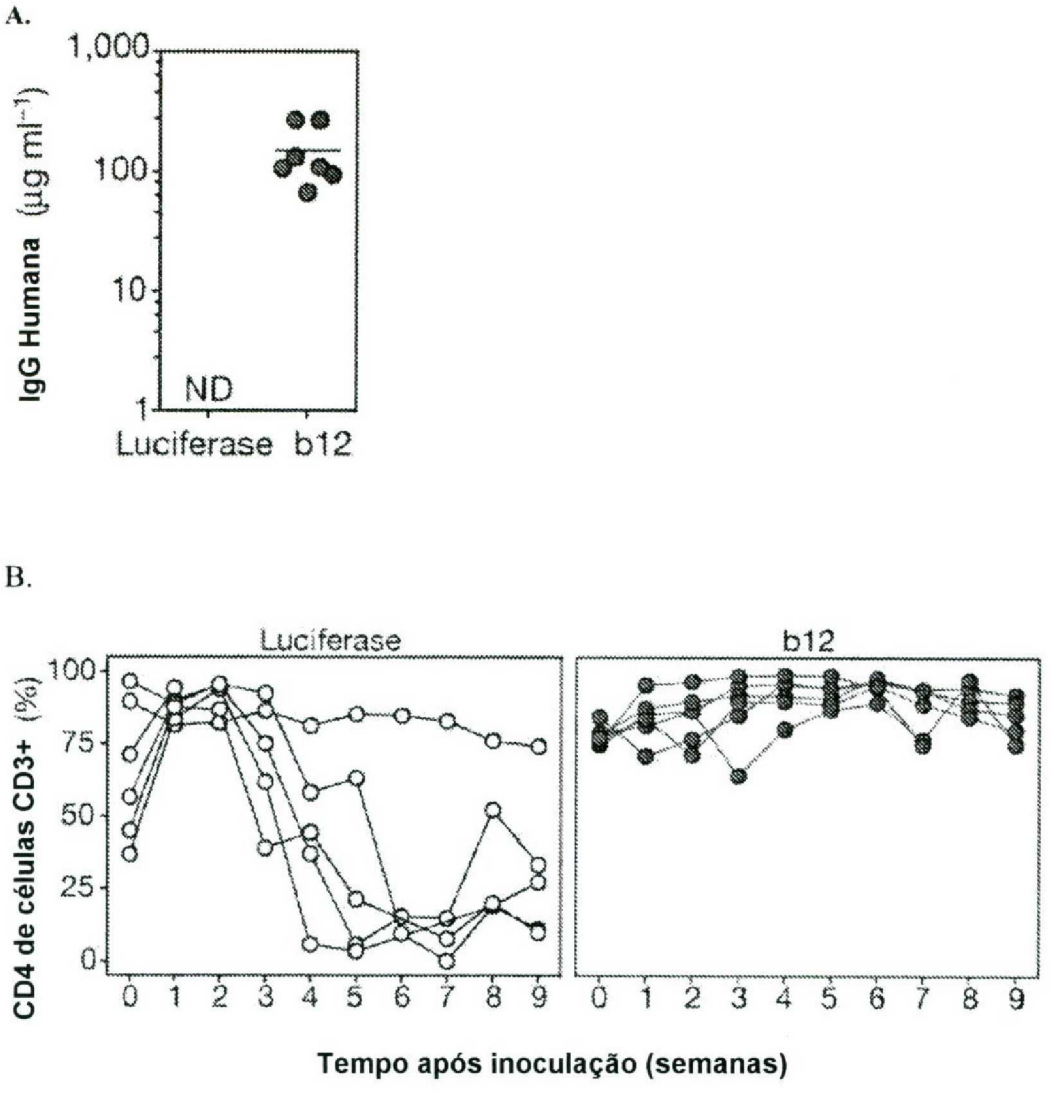
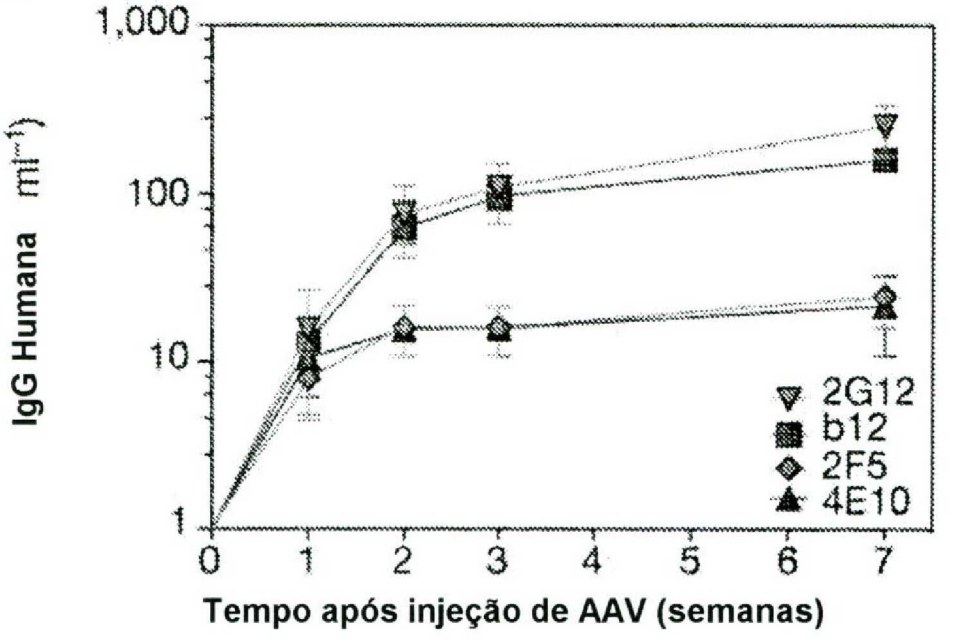

A.
1,000
100
10
1
IgG Humana (µg ml⁻¹)
ND
Luciferase b12
B.
Luciferase
b12
100
75
50
25
0
CD4 de células CD3+ (%)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Tempo após inoculação (semanas)

FIG.9

A.


1,000
100
10
1
IgG Humana (ml⁻¹)
0
1
2
3
4
5
6
7
Tempo após injeção de AAV (semanas)
2G12
b12
2F5
4E10

B.

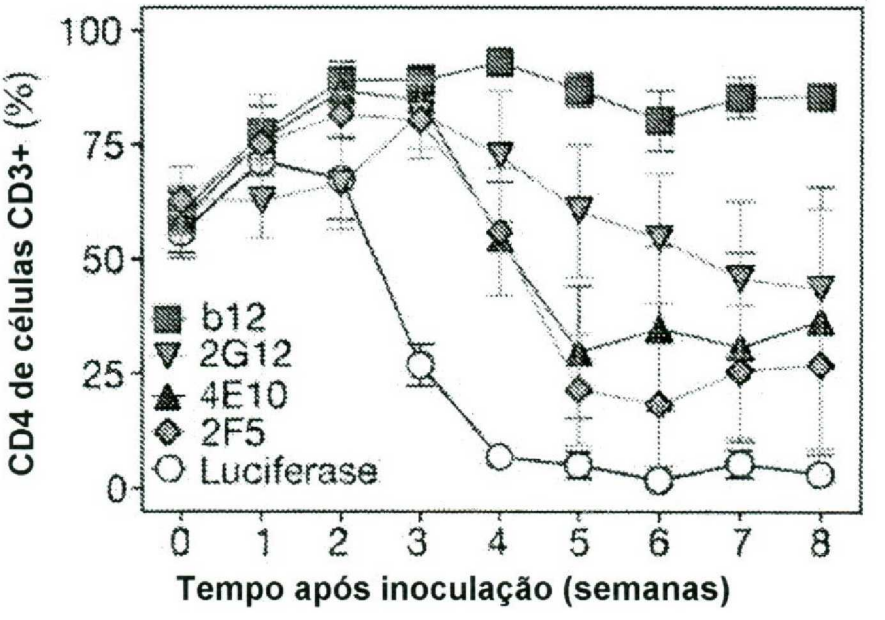
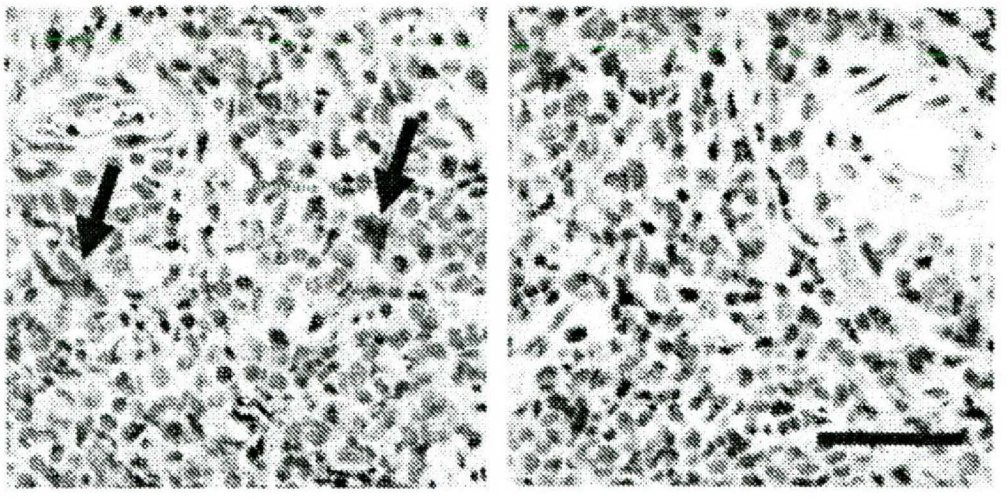

100
75
50
25
0
CD4 de células CD3+ (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Tempo após inoculação (semanas)
b12
2G12
4E10
2F5
Luciferase

FIG.9 (CONTINUAÇÃO)

C.



D.

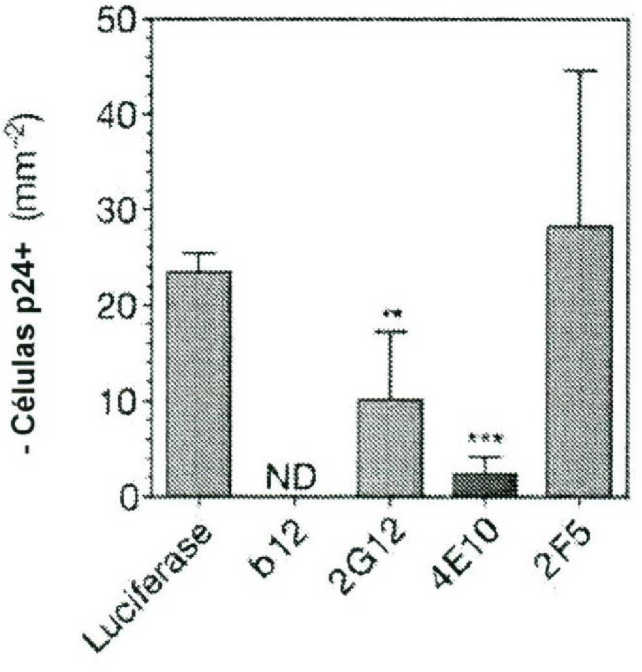
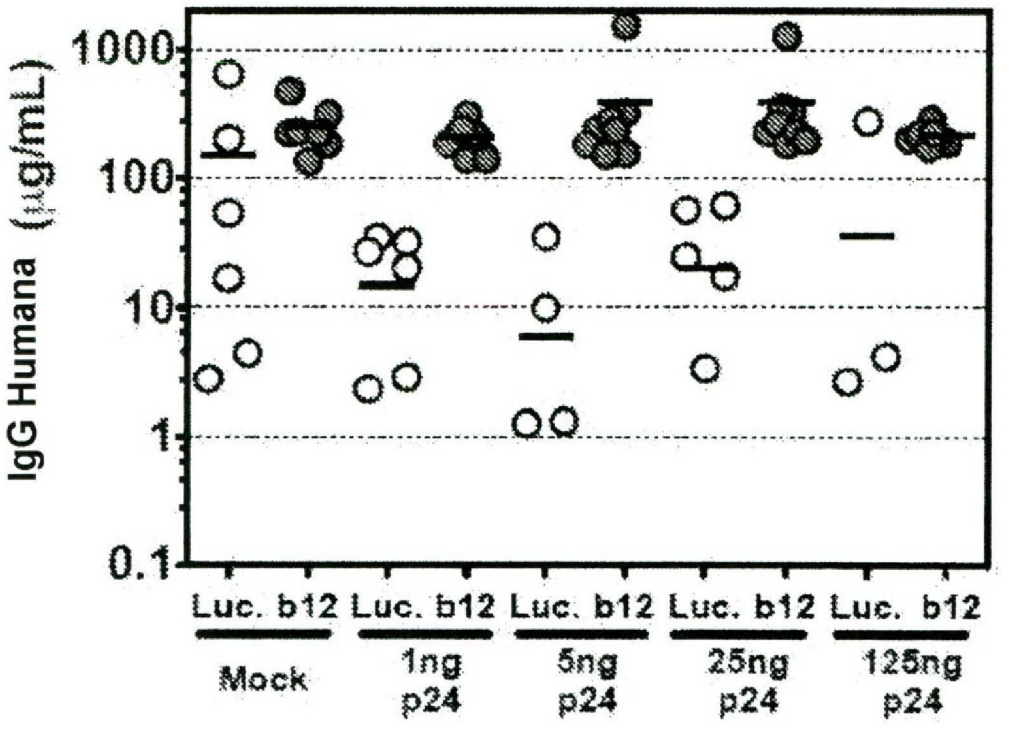
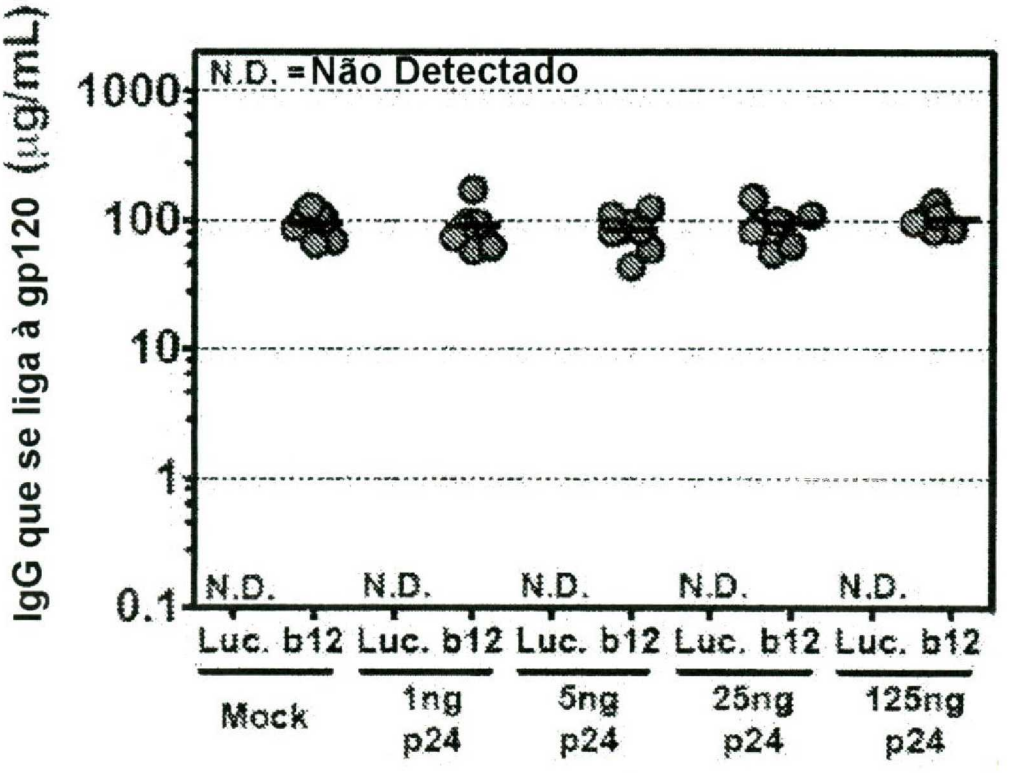


FIG.10

A.


IgG Humana (µg/mL)
1000
100
10
1
0.1
Luc. b12
Luc. b12
Luc. b12
Luc. b12
Luc. b12
Mock
1ng p24
5ng p24
25ng p24
125ng p24

B.


IgG que se liga à gp120 (µg/mL)
N.D. = Não Detectado
1000
100
10
1
0.1
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
Luc. b12
Luc. b12
Luc. b12
Luc. b12
Luc. b12
Mock
1ng p24
5ng p24
25ng p24
125ng p24

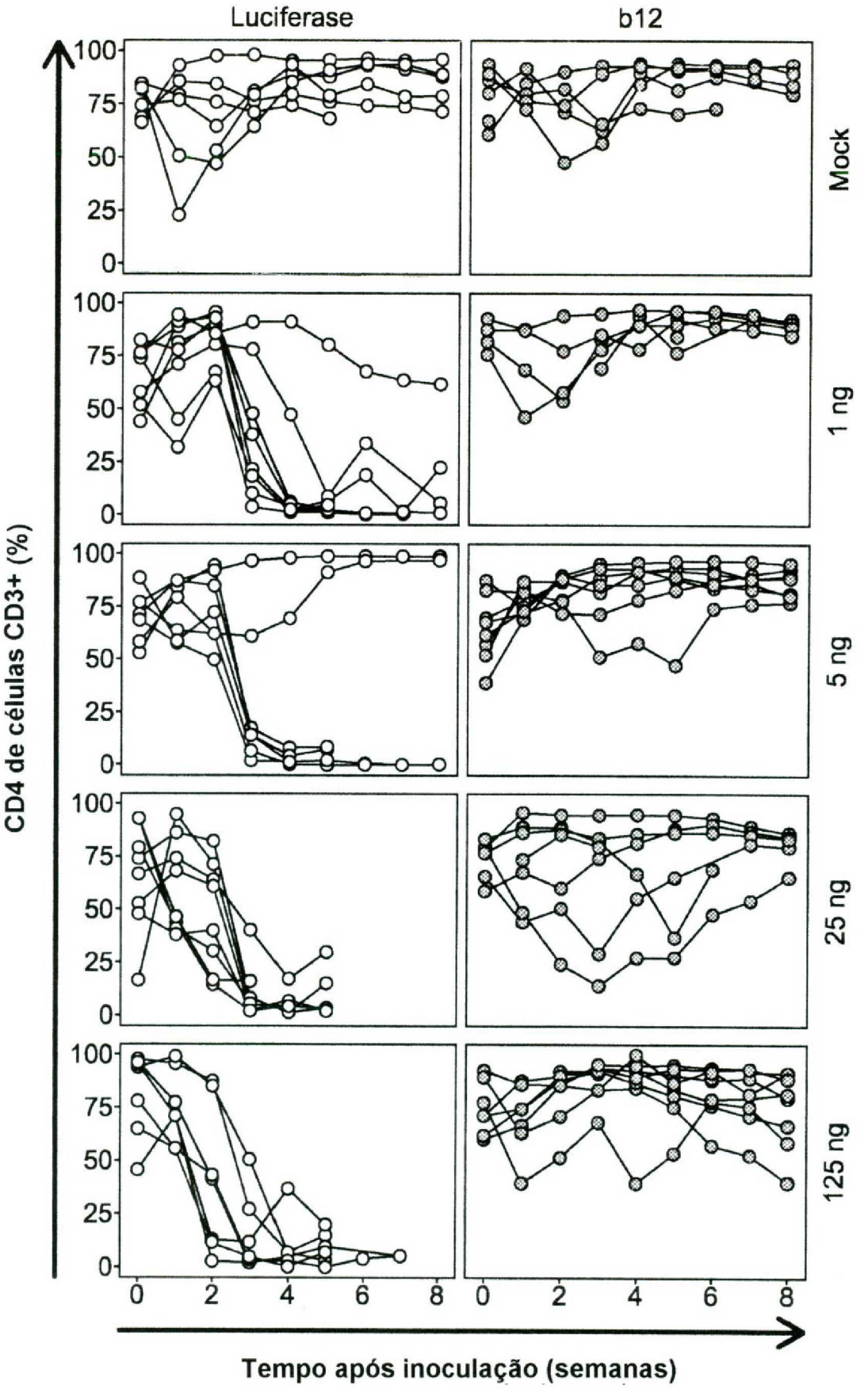
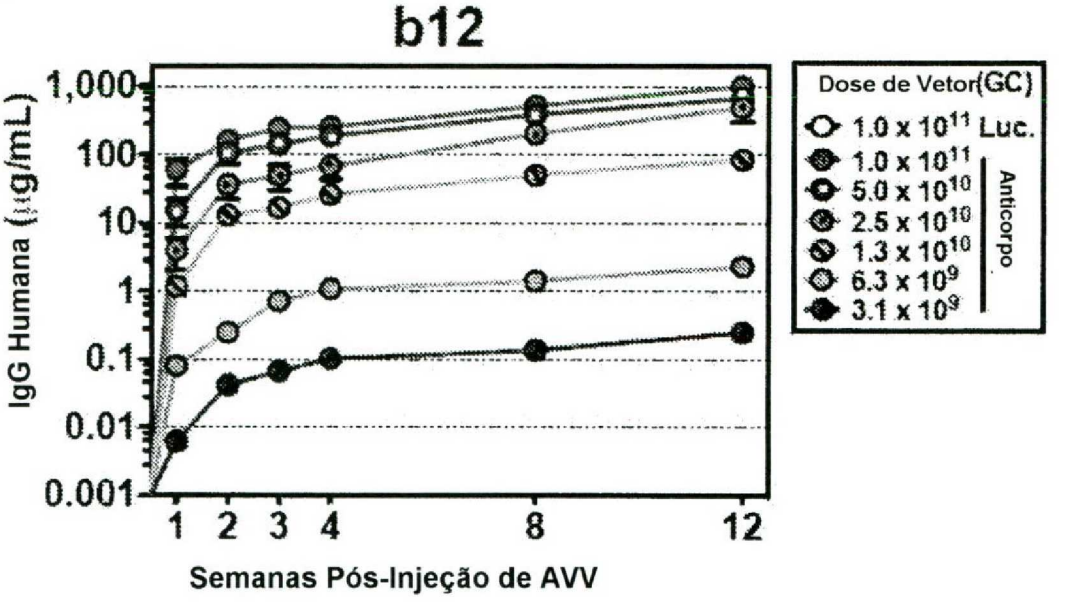

Luciferase
b12
Mock
1 ng
5 ng
25 ng
125 ng
CD4 de células CD3+ (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
Tempo após inoculação (semanas)

FIG.12

A.


b12
IgG Humana (µg/mL)
1,000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
1 2 3 4 8 12
Semanas Pós-Injeção de AVV
Dose de Vetor(GC)
1.0 x 10^11 Luc.
1.0 x 10^11
5.0 x 10^10
2.5 x 10^10
1.3 x 10^10
6.3 x 10^9
3.1 x 10^9
Anticorpo

B.

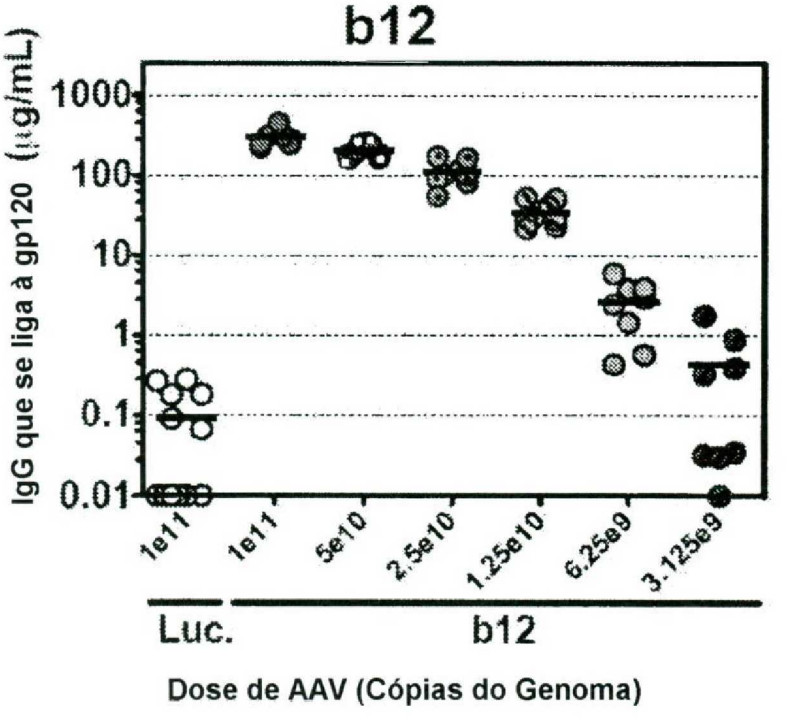

b12
IgG que se liga à gp120 (µg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0.01
1e11
1e11
5e10
2.5e10
1.25e10
6.25e9
3.125e9
Luc.
b12
Dose de AAV (Cópias do Genoma)

FIG.12 (CONTINUAÇÃO)

C.

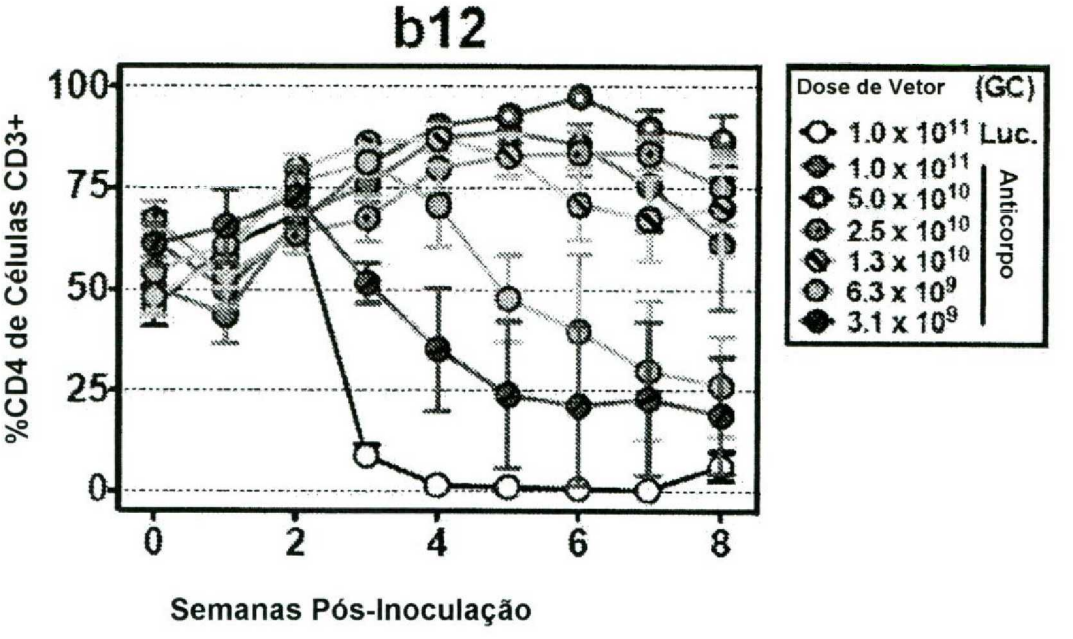
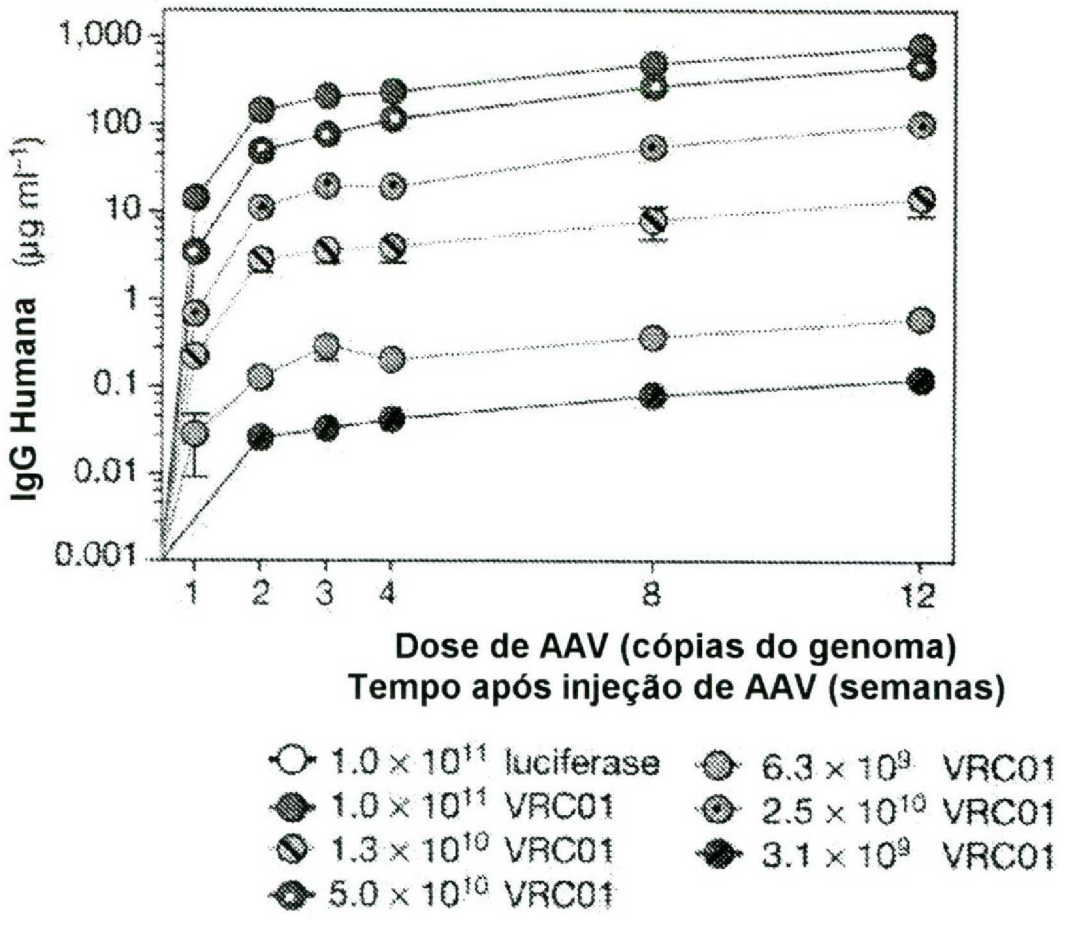


FIG.13

A.


1,000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
IgG Humana (µg ml⁻¹)
1
2
3
4
8
12
Dose de AAV (cópias do genoma)
Tempo após injeção de AAV (semanas)
1.0 × 10¹¹ luciferase
1.0 × 10¹¹ VRC01
1.3 × 10¹⁰ VRC01
5.0 × 10¹⁰ VRC01
6.3 × 10⁹ VRC01
2.5 × 10¹⁰ VRC01
3.1 × 10⁹ VRC01

B.

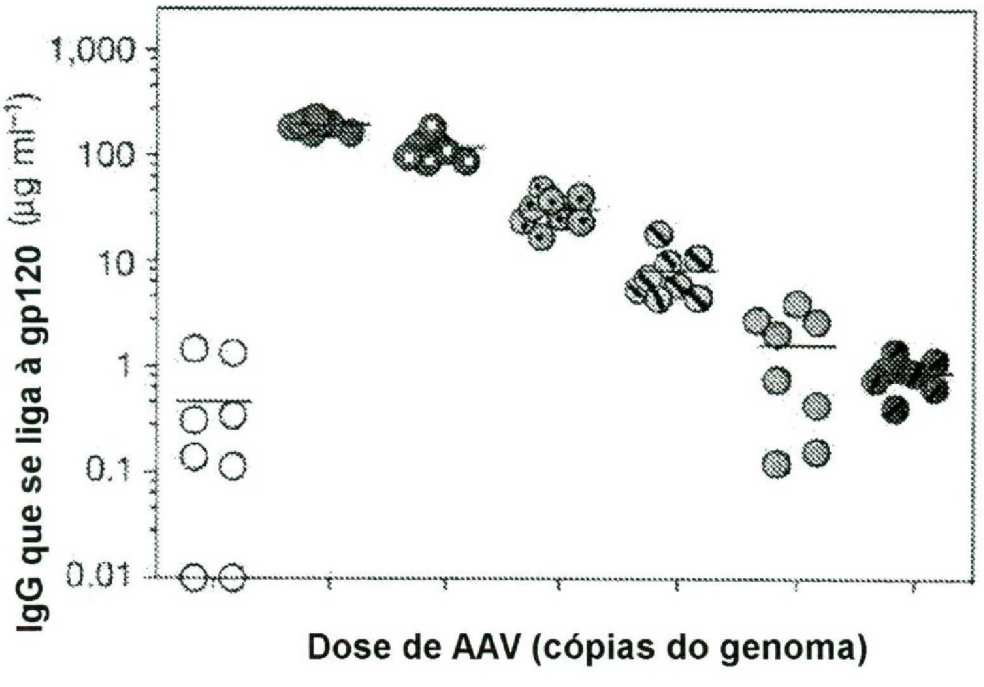

1,000
100
10
1
0.1
0.01
IgG que se liga à gp120 (µg ml⁻¹)
Dose de AAV (cópias do genoma)

FIG.13 (CONTINUAÇÃO)

C.

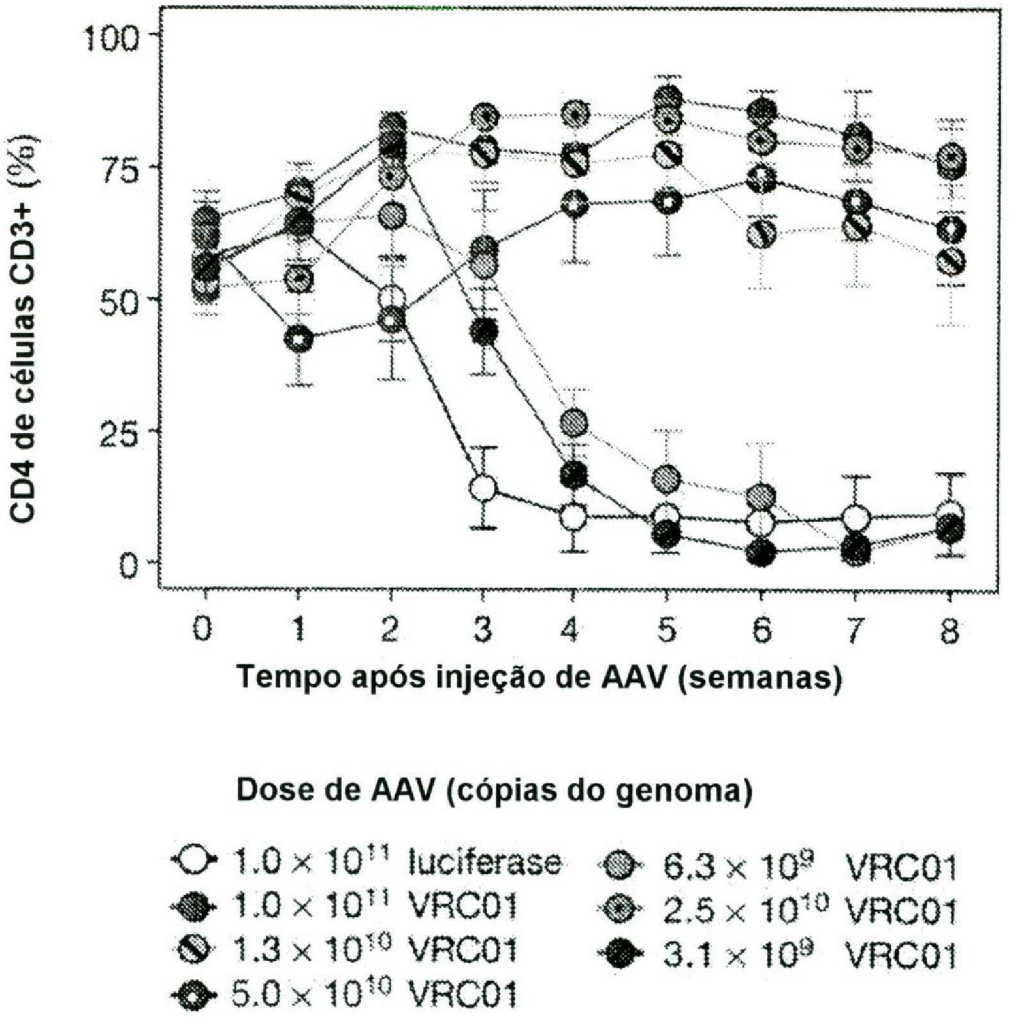


FIG.14

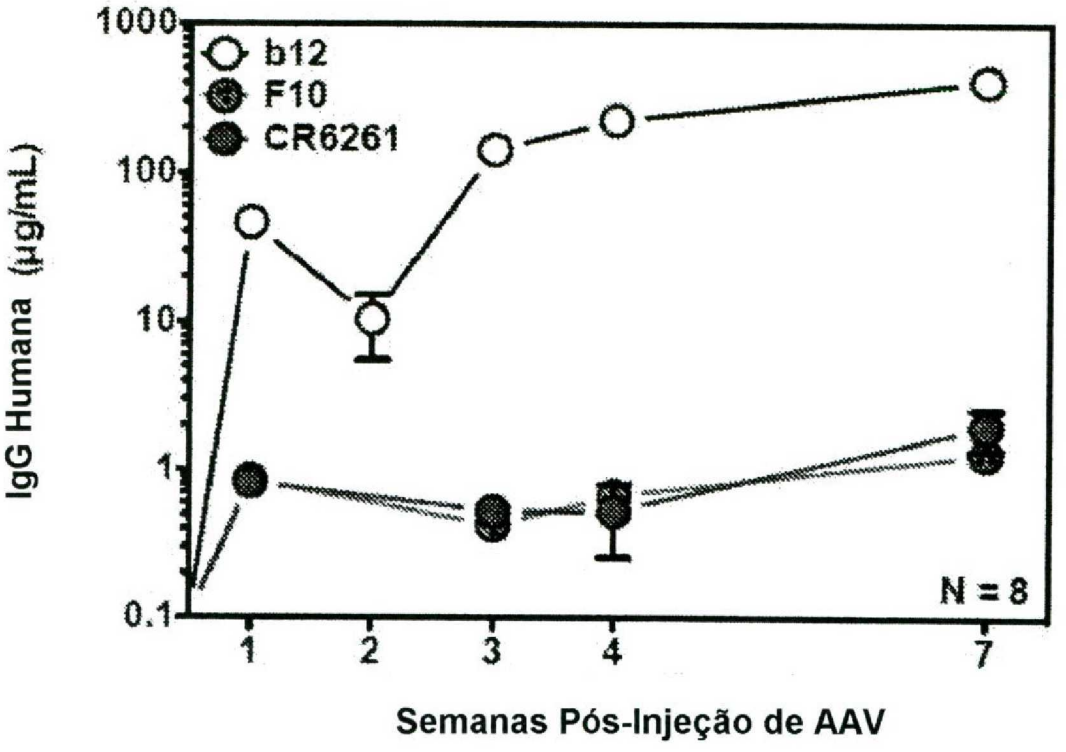
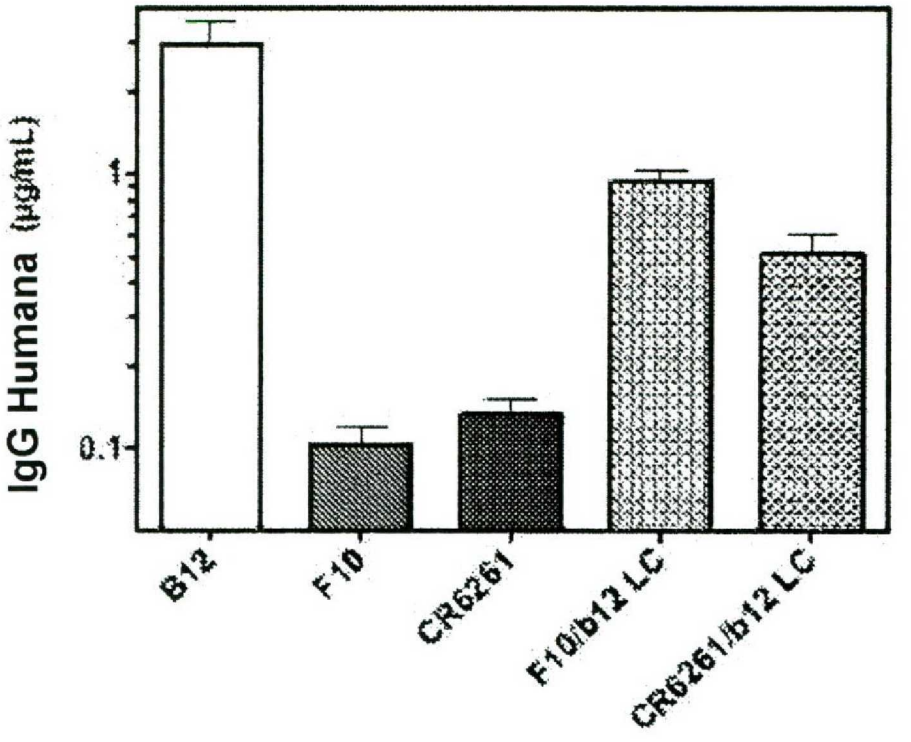

1000
100
10
1
0.1
IgG Humana (µg/mL)
b12
F10
CR6261
N = 8
1
2
3
4
7
Semanas Pós-Injeção de AAV

FIG.15

A.

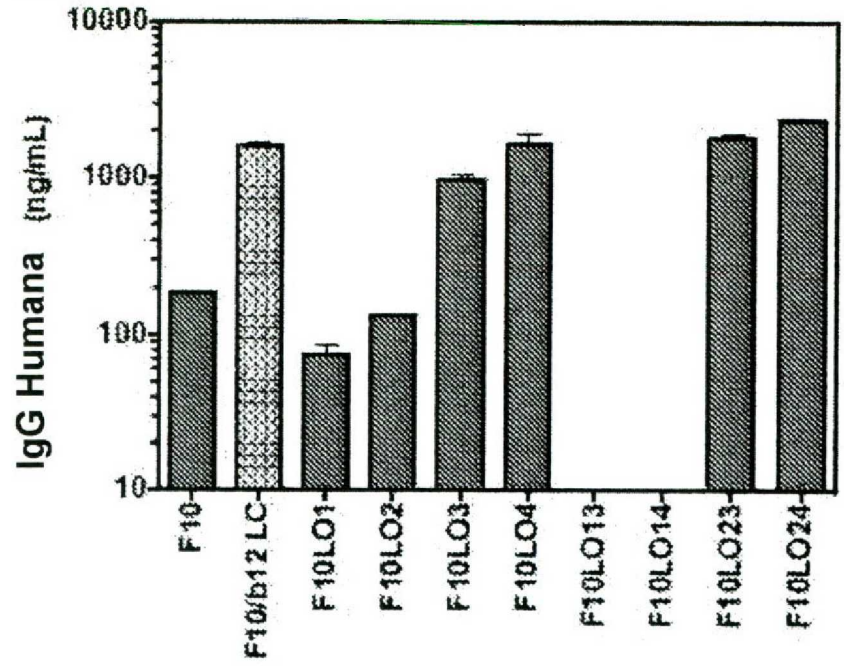


B.

Abreviação	Descrição da Substituição
LO1	5' b12 (6aa)
LO2	5' b12 (22aa)
LO3	3' b12 (6aa)
LO4	3' 4E10 (6aa)
LO13	5' b12 (6aa) + 3' b12 (6aa)
LO14	5' b12 (6aa) + 3' 4E10 (6aa)
LO23	5' b12 (22aa) + 3' b12 (6aa)
LO24	5' b12 (22aa) + 3' 4E10 (6aa)

FIG.15 (CONTINUAÇÃO)

C.



D.

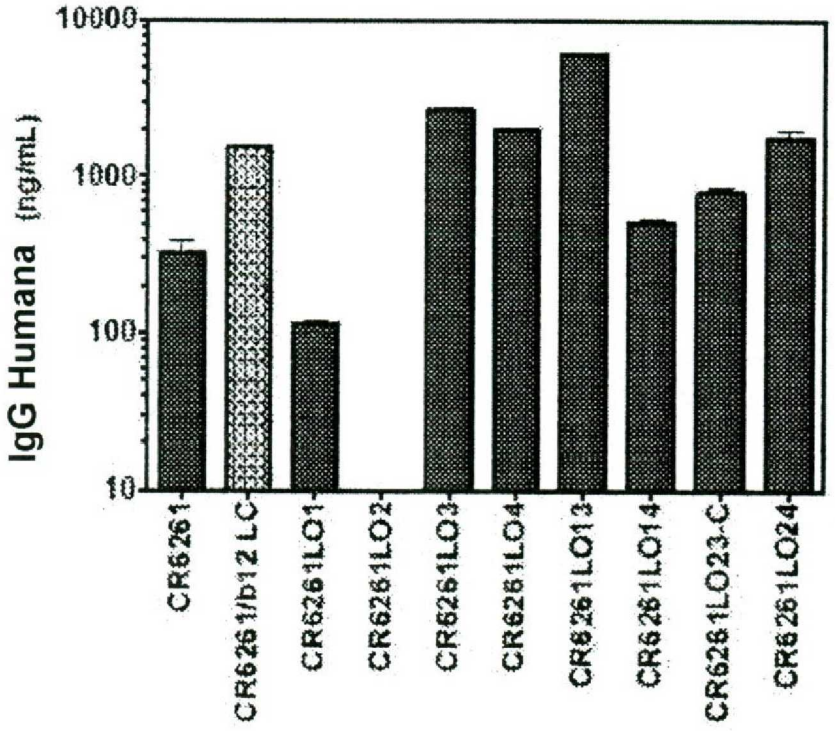
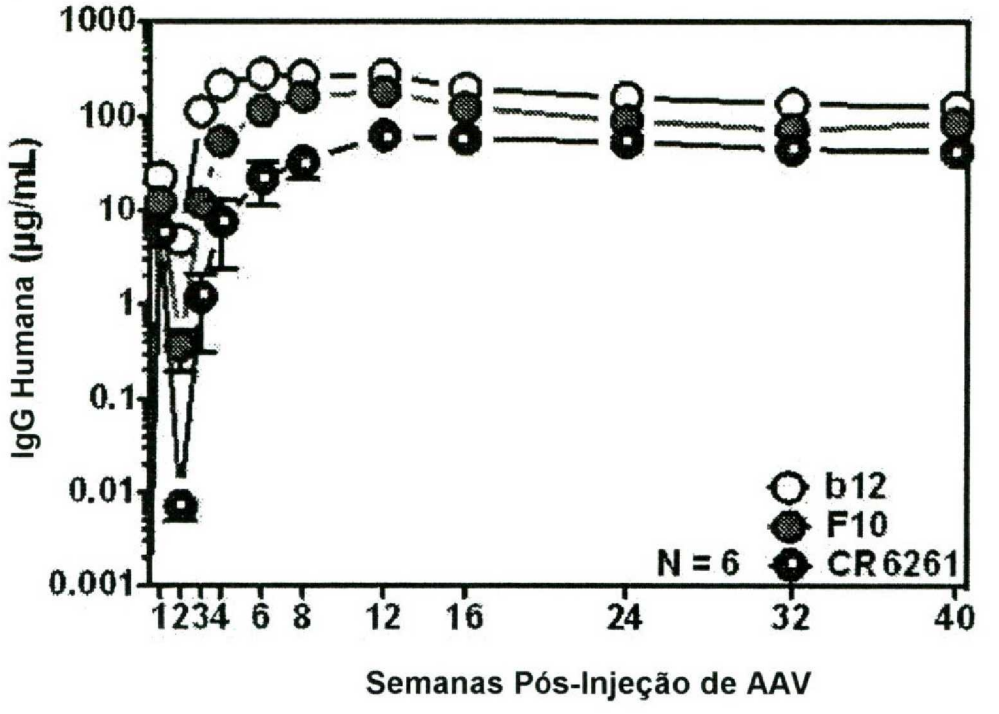


FIG.16

A.


1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
IgG Humana (µg/mL)
b12
F10
CR6261
N = 6
1 2 3 4 6 8 12 16 24 32 40
Semanas Pós-Injeção de AAV

B.

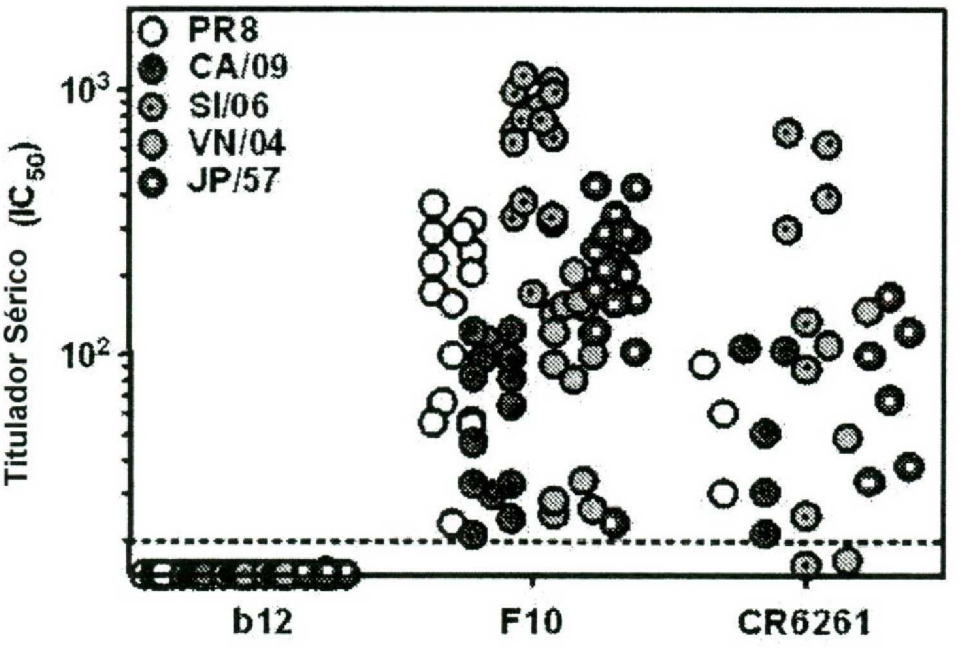
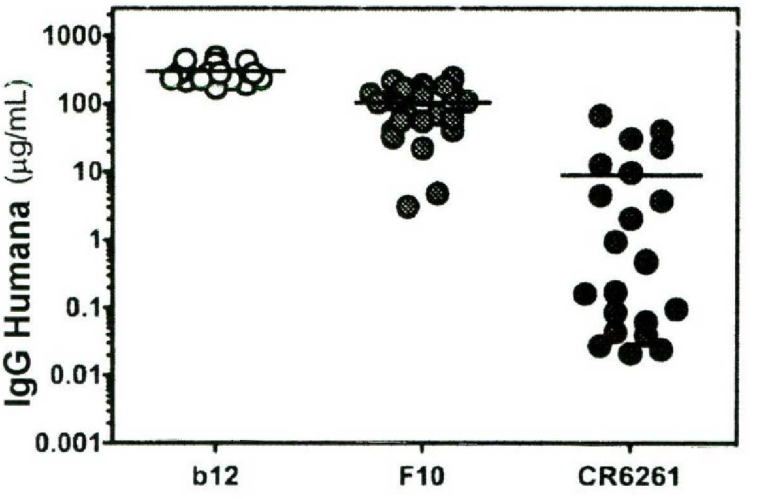
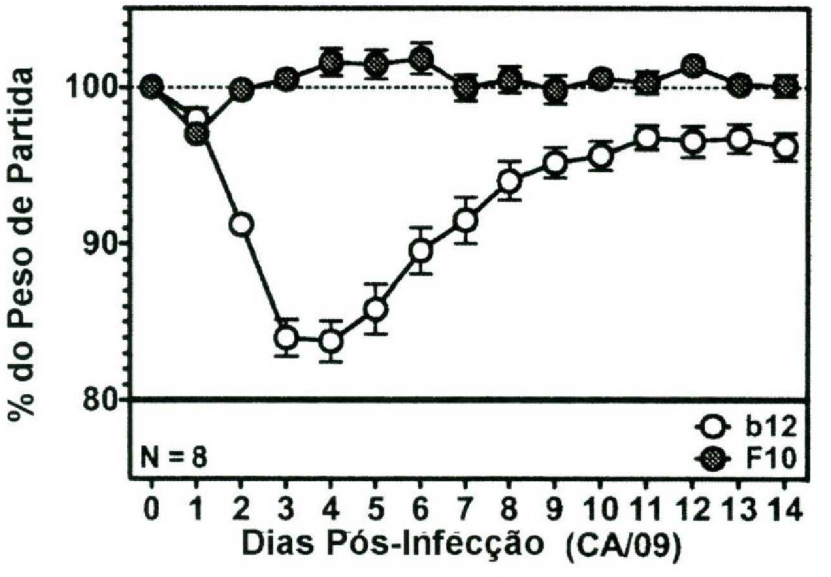

PR8
CA/09
SI/06
VN/04
JP/57
10^3
10^2
Titulador Sérico (IC_{50})
b12
F10
CR6261

FIG.17

A.


IgG Humana (µg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
b12
F10
CR6261

B.


% do Peso de Partida
100
90
80
N = 8
b12
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Dias Pós-Infecção (CA/09)

C.

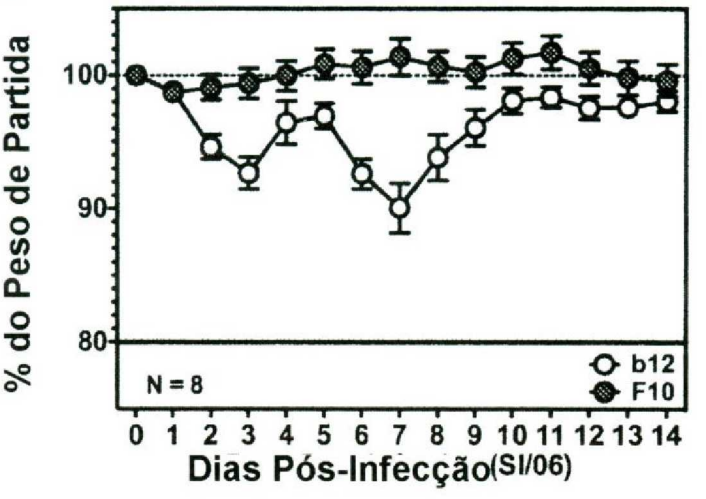
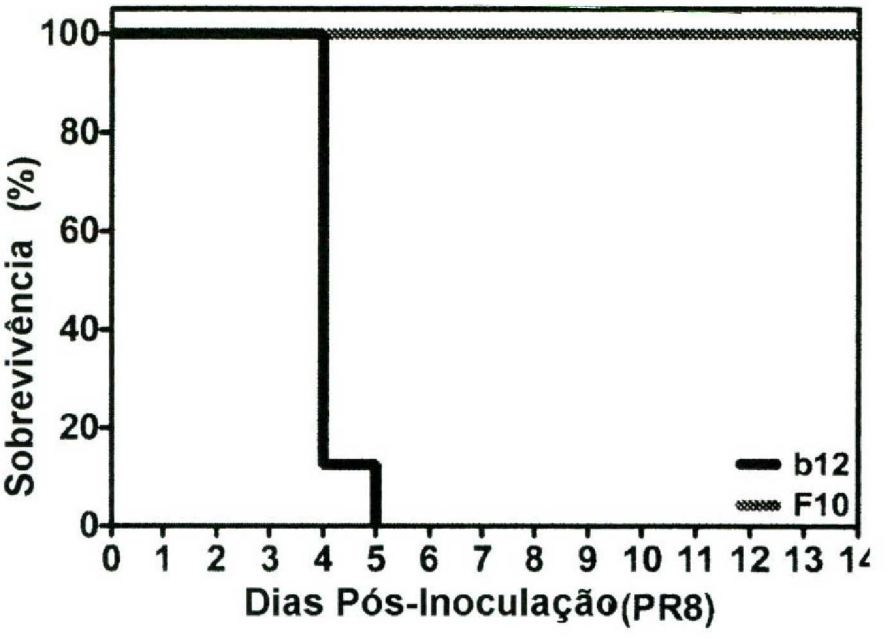

% do Peso de Partida
100
90
80
N = 8
b12
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Dias Pós-Infecção(SI/06)

FIG.17 (CONTINUAÇÃO)

D.



E.

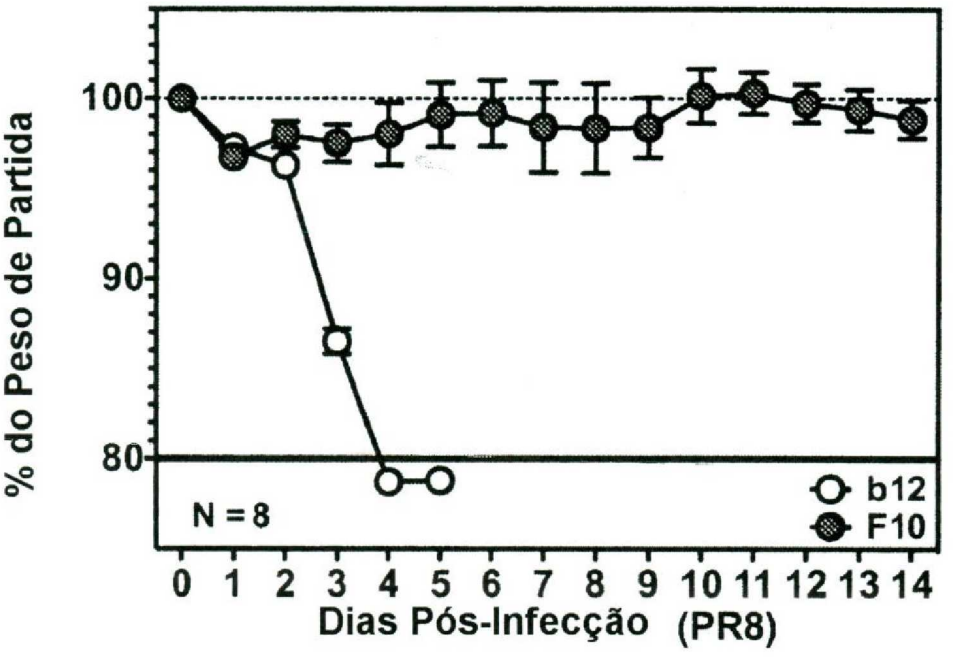
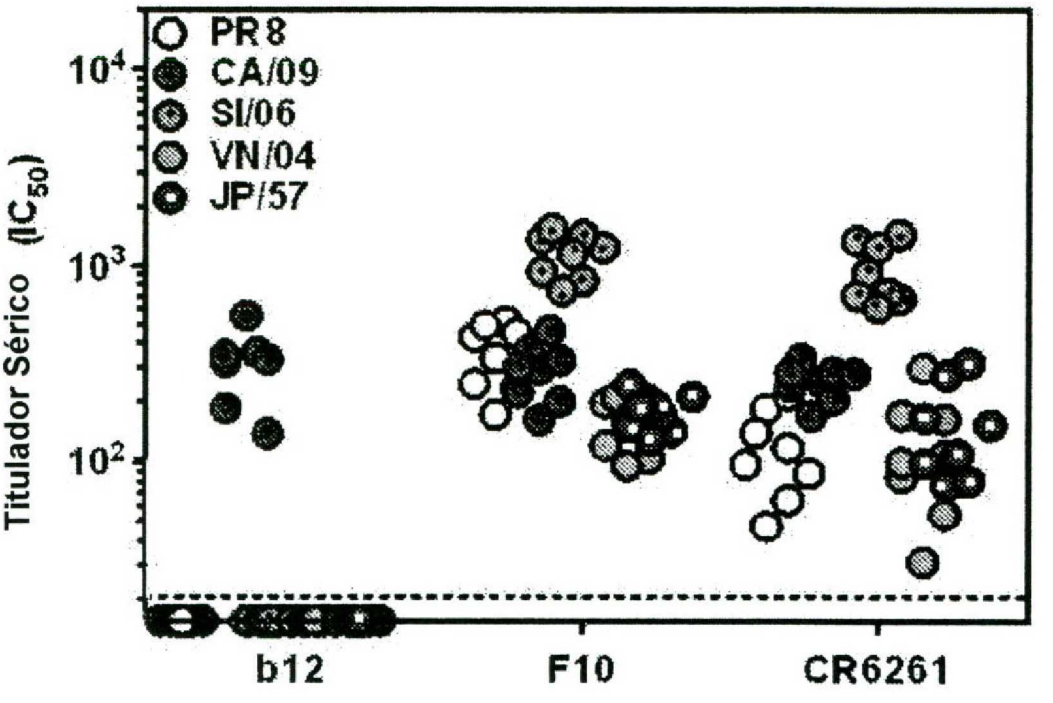


FIG.17 (CONTINUAÇÃO)

F.



G.

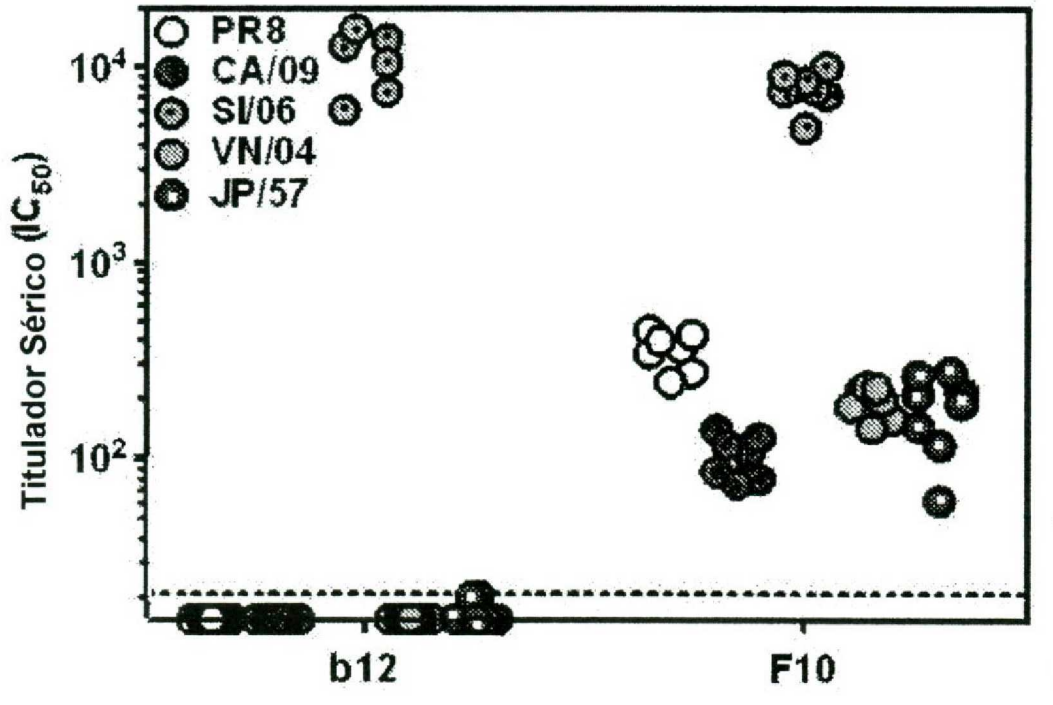
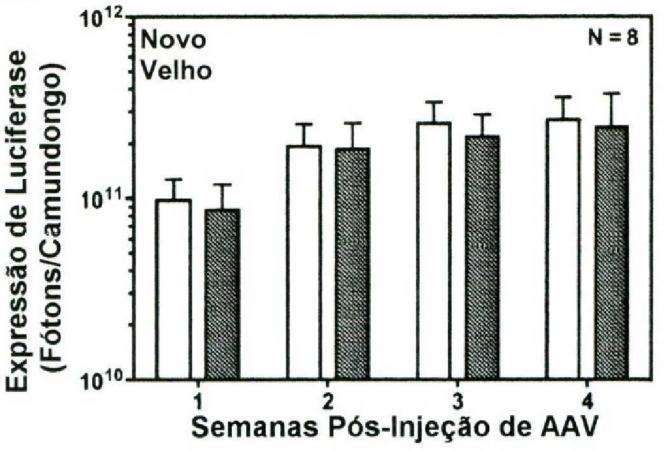
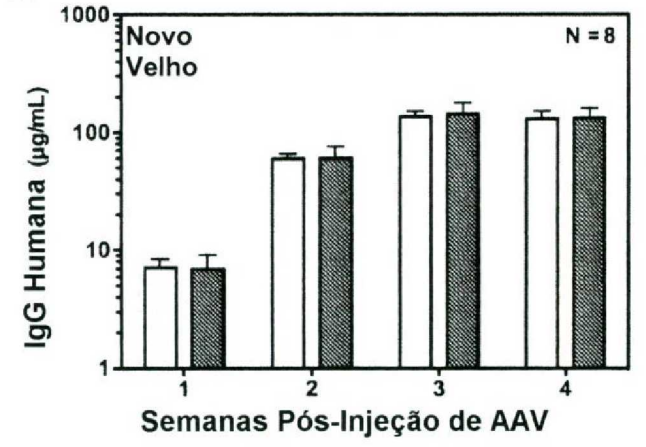


FIG.18

A.


Novo
Velho
N = 8
Expressão de Luciferase
(Fótons/Camundongo)
10^{12}
10^{11}
10^{10}
1
2
3
4
Semanas Pós-Injeção de AAV

B.


Novo
Velho
N = 8
IgG Humana (µg/mL)
1000
100
10
1
1
2
3
4
Semanas Pós-Injeção de AAV

C.

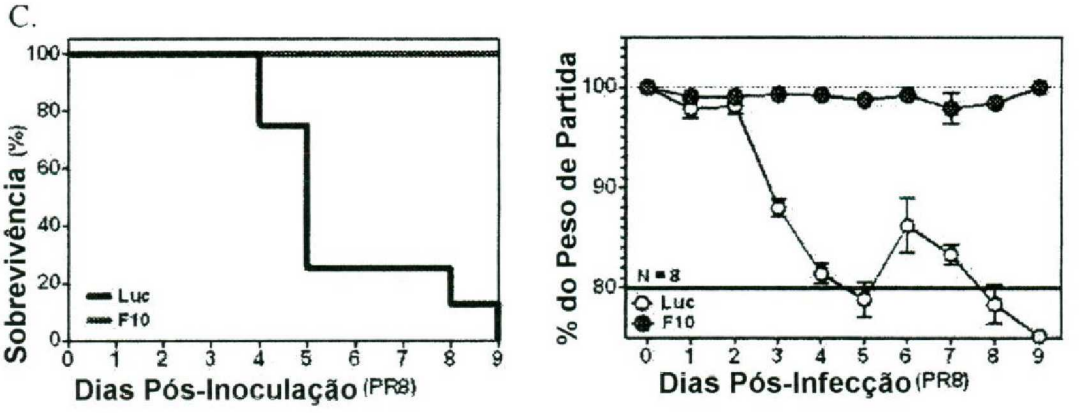
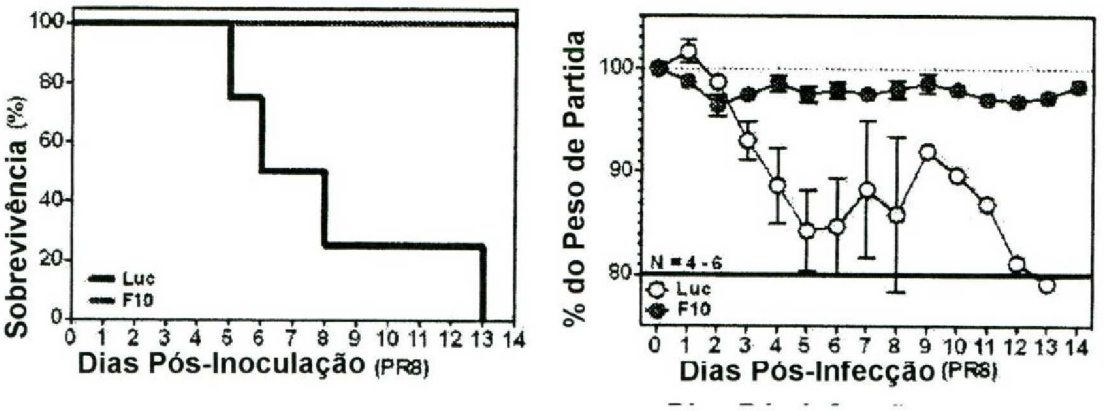

Sobrevivência (%)
100
80
60
40
20
0
Luc
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Dias Pós-Inoculação (PR8)
% do Peso de Partida
100
90
80
N = 8
Luc
F10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Dias Pós-Infecção (PR8)

FIG.18 (CONTINUAÇÃO)

D.



E.

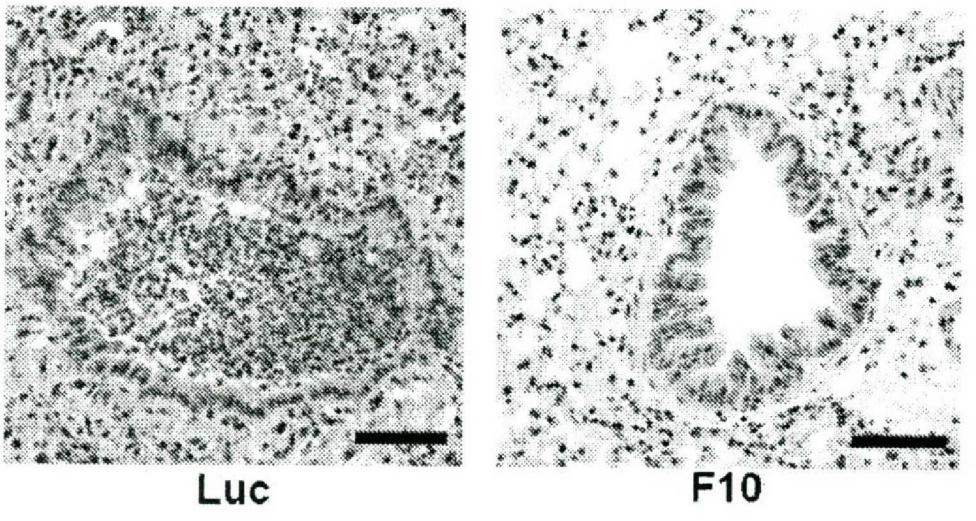
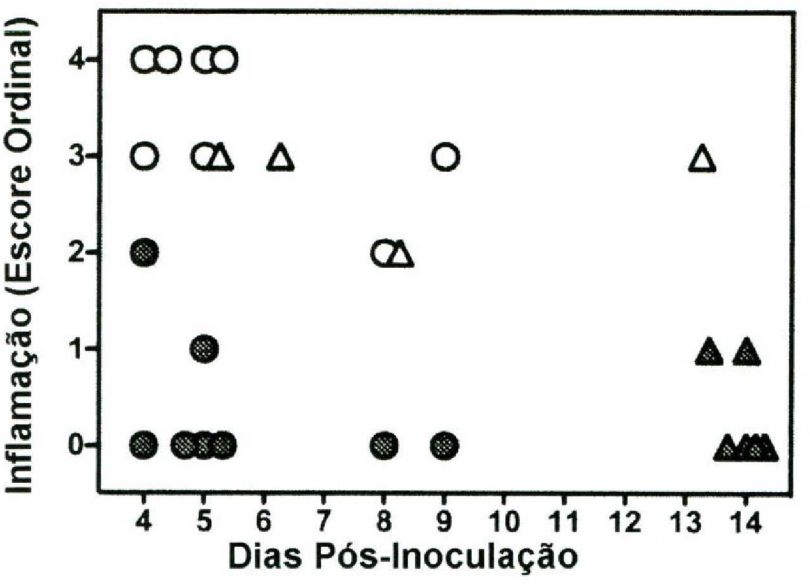


FIG.18 (CONTINUAÇÃO)

F.



G.

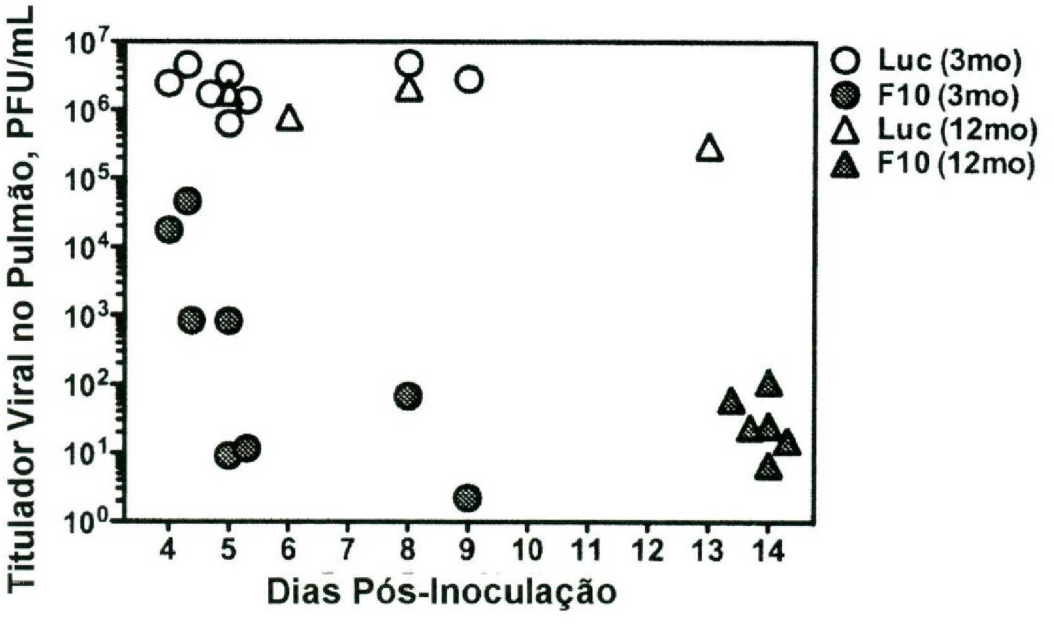
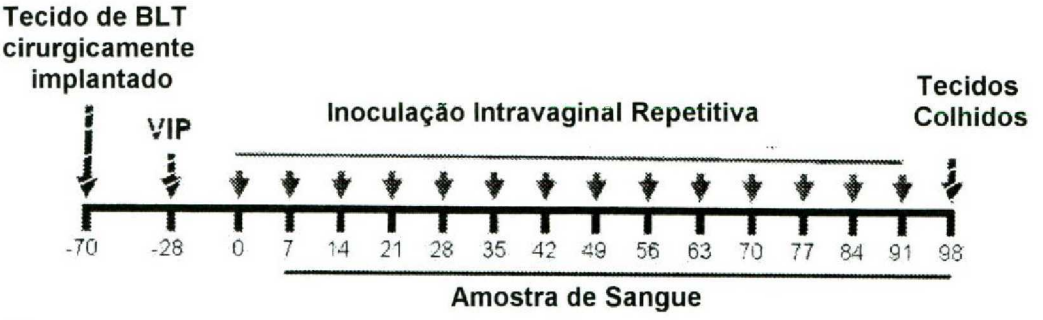
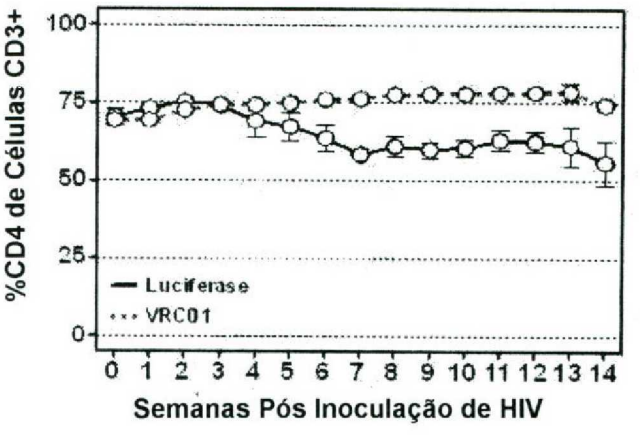


FIG.19

A.


Tecido de BLT cirurgicamente implantado
VIP
Inoculação Intravaginal Repetitiva
Tecidos Colhidos
-70
-28
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
70
77
84
91
98
Amostra de Sangue

B.


%CD4 de Células CD3+
100
75
50
25
0
Luciferase
VRC01
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Semanas Pós Inoculação de HIV

C.

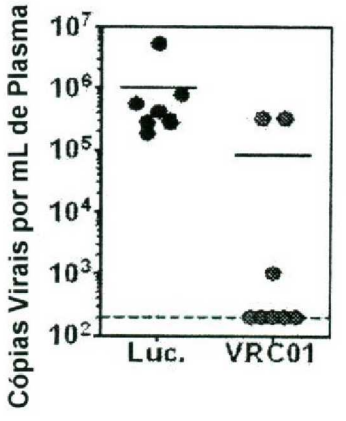
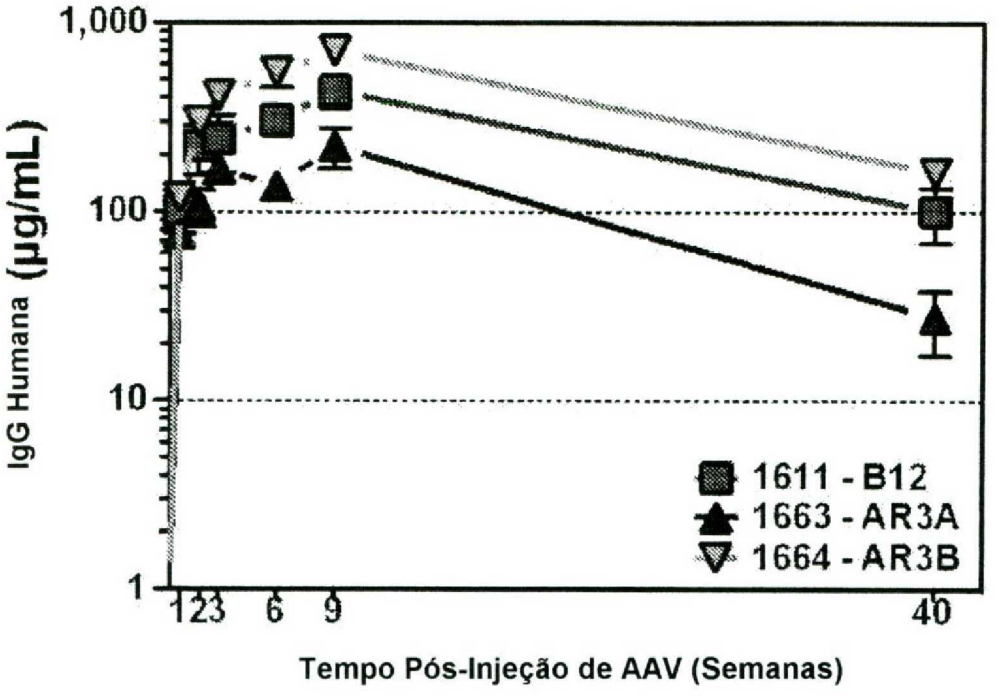

Cópias Virais por mL de Plasma
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
Luc.
VRC01

FIG.20


1,000
100
10
1
IgG Humana (µg/mL)
1
2
3
6
9
40
Tempo Pós-Injeção de AAV (Semanas)
1611 - B12
1663 - AR3A
1664 - AR3B