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

(21) BR 112021007550-0 A2

(22) Data do Depósito: 24/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/07/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL

(51) Int. Cl.: G01N 33/68.

(30) Prioridade Unionista: 25/10/2018 US 62/750,583.

(71) Depositante(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

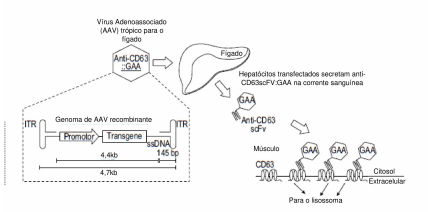
(72) Inventor(es): SHUNHAI WANG.

(86) Pedido PCT: PCT US2019057936 de 24/10/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/086893 de 30/04/2020

(85) Data da Fase Nacional: 20/04/2021

(57) Resumo: MÉTODOS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL. A presente invenção refere-se a métodos para determinar a estequiometria de um capsídeo viral e/ou determinar a heterogeneidade dos componentes da proteína em um capsídeo viral.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **“MÉTODOS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL”.**

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício sob 35 USC §119(e) do Pedido Provisório US Nº 62/750,583, depositado em 25 de outubro de 2018, que é incorporado neste documento por referência em sua totalidade para todos os fins.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a métodos para determinar a heterogeneidade de uma partícula viral, tal como uma partícula de vírus adeno-associado (AAV) usando cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) e determinação de espectrometria de massa.

ANTECEDENTES

[003] A terapia gênica surgiu como um tratamento alternativo para doenças genéticas. A terapia gênica envolve a transferência de algum material genético (DNA, RNA ou oligonucleotídeos) para as células alvo. Na prática, o gene de interesse (também chamado de transgene) deve ser transmitido à célula por um vetor, que carrega uma molécula de DNA ou RNA. Baseia-se na transferência de genes funcionais para substituir ou suplementar genes defeituosos. O transgene pode ser transmitido à célula pelo vetor. O método de transmissão difere dependendo do tipo de tratamento e órgão/tecido a ser direcionado.

[004] Partículas virais surgiram como vetores para terapia gênica e tratamento de doenças. Os vetores virais, como aqueles baseados no genoma do vírus adeno-associado (AAV), oferecem plataformas interessantes para a transmissão de genes. Atualmente, foram descritos 12 sorotipos humanos de AAV (AAV1-12), muitos dos quais possuem tropismo celular e tecidual distinto, potencialmente criando a opção de gerar uma variedade de diferentes classes de vetores desse gênero

viral.

[005] No entanto, um dos problemas para a adoção de vetores virais na terapia gênica é a caracterização da homogeneidade das partículas virais. Embora as técnicas clássicas, como microscopia eletrônica e Southern Blots, possam caracterizar a heterogeneidade da partícula viral, como a heterogeneidade e agregação de AAV, elas não fornecem resolução suficiente para quantificar a homogeneidade quando se trata de produzir preparações de vetor viral de grau clínico. A caracterização completa das proteínas do capsídeo viral constituintes, como as proteínas do capsídeo de vetores AAV, incluindo suas sequências e modificações pós-tradução (PTMs), é altamente recomendada para garantir a qualidade e consistência do produto. Assim, métodos são necessários para determinar a homogeneidade das partículas virais.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar a estequiometria de componentes de proteína de um capsídeo viral de uma partícula viral, em que o método compreende: (a) submeter uma amostra de partículas virais a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) para separar os componentes da proteína do capsídeo viral das partículas virais; (b) determinar as massas dos componentes da proteína do capsídeo viral para identificar os componentes da proteína separados por HILIC; e (c) determinar a abundância relativa dos componentes da proteína do capsídeo viral a partir da separação de HILIC, determinando assim a estequiometria dos componentes da proteína de um capsídeo viral de uma partícula viral.

[007] Em outro aspecto, a presente invenção fornece um método para determinar a heterogeneidade de proteínas em um capsídeo de uma partícula viral, em que o método compreende: (a) submeter a partícula viral a HILIC para separar componentes de proteína do

capsídeo de partícula viral; (b) determinar as massas dos componentes da proteína do capsídeo da proteína; e (c) comparar as massas determinadas dos componentes da proteína do capsídeo da partícula viral com massas teóricas, em que um desvio de uma ou mais das massas dos componentes da proteína do capsídeo da partícula viral das massas teóricas é indicativo da heterogeneidade do capsídeo.

[008] Em algumas modalidades, a partícula viral compreende uma partícula de vírus adeno-associado (AAV).

[009] Em algumas modalidades, os componentes da proteína do capsídeo viral compreendem VP1, VP2 e VP3 da partícula de AAV.

[0010] Em algumas modalidades, a heterogeneidade compreende um ou mais dos serotipos mistos, capsídeos variantes, substituições de aminoácidos do capsídeo, capsídeos truncados ou capsídeos modificados.

[0011] Em algumas modalidades, a partícula AAV compreende um capsídeo AAV1, um capsídeo AAV2, um capsídeo AAV3, um capsídeo AAV4, um capsídeo AAV5, um capsídeo AAV6, um capsídeo AAV7, um capsídeo AAV8, um capsídeo AAVrh8, um capsídeo AAV9, um AAV10 capsídeo, um capsídeo AAV11, um capsídeo AAV 12 ou uma variante destes.

[0012] Em algumas modalidades, as massas de VP1, VP2 e VP3 são comparadas às massas teóricas de um ou mais de um capsídeo AAV1, um capsídeo AAV2, um capsídeo AAV3, um capsídeo AAV4, um capsídeo AAV5, um capsídeo AAV6, um capsídeo AAV7, um capsídeo AAV8, um capsídeo AAVrh8, um capsídeo AAV9, um capsídeo AAV10, um capsídeo AAV11, um capsídeo AAV 12 ou uma variante destes.

[0013] Em algumas modalidades, a partícula de AAV compreende uma sequência de repetição terminal invertida de AAV1 (ITR), uma AAV2 ITR, uma AAV3 ITR, uma AAV4 ITR, uma AAV5 ITR, uma AAV6 ITR, uma AAV7 ITR, uma AAV8 ITR, uma AAVrh8 ITR, uma AAV9 ITR,

uma AAV 10 ITR, uma AAVrh10 ITR, uma AAV11 ITR ou uma AAV12 ITR.

[0014] Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo selecionado para transdução de células do fígado de um indivíduo.

[0015] Em algumas modalidades, a partícula de AAV é uma partícula de AAV recombinante (rAAV).

[0016] Em algumas modalidades, a partícula de AAV compreende um vetor de AAV que codifica um transgene heterólogo.

[0017] Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo de AAV7, AAV8 ou AAV9.

[0018] Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um sorotipo de capsídeo AAV9.

[0019] Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo de AAV9 e é um vetor viral que codifica a alfa glucosidase lisossomal (GAA) ligada a um anticorpo anti-CD63.

[0020] Em algumas modalidades, a partícula viral compreende um vetor viral que codifica um transgene heterólogo.

[0021] Em algumas modalidades, a partícula viral pertence a uma família viral selecionada do grupo que consiste em Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae e Herpesviridae.

[0022] Em algumas modalidades, a partícula viral pertence a um gênero viral selecionado a partir do grupo que consiste em Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus, Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepandensovirus, Iteradensovirus, Penstyldensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Eritroparvovirus, Protoparvovirus, Tetraparvovirus, Alfaretrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus, Lentivirus, Spumavirus, Alphabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus,

Gammabaculovirus, Iltovirus, Mardivirus, Simplexvirus, Varicellovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus, Roseolovirus, Linfocriptovirus, Macavirus, Percavirus, e Rhadinovirus.

[0023] Em algumas modalidades, o Retroviridae é o vírus do sarcoma murino Moloney (MoMSV), vírus do sarcoma murino Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário murino (MuMTV), vírus da leucemia do macaco gibão (GaLV), vírus da leucemia felina (FLV), spumavírus, vírus Friend, vírus da célula-tronco murina (MSCV), vírus Rous Sarcoma (RSV), vírus da leucemia de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da imunodeficiência equina (EIV), vírus visna-maedi; vírus da artrite-encefalite caprina; vírus da anemia infecciosa equina; vírus da imunodeficiência felina (FIV); vírus da imunodeficiência bovina (BIV); ou vírus da imunodeficiência símia (SIV).

[0024] Em algumas modalidades, o HILIC usa uma fase móvel A compreendendo ácido trifluoroacético em água.

[0025] Em algumas modalidades, a fase móvel A compreende cerca de 0,1% de ácido trifluoroacético.

[0026] Em algumas modalidades, a cromatografia compreende uma fase móvel B compreendendo ácido trifluoroacético em acetonitrila.

[0027] Em algumas modalidades, a fase móvel B compreende cerca de 0,1% de ácido trifluoroacético.

[0028] Em algumas modalidades, a proporção de fase móvel A na cromatografia aumenta ao longo do tempo.

[0029] Em algumas modalidades, a fase móvel A aumenta de cerca de 15% a cerca de 100%, ao longo de cerca de 45 minutos.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0030] A Figura 1 é um modelo esquemático de um possível regime de tratamento para a doença de Pompe que inclui o uso de um vírus adeno-associado (AAV) como um vetor para terapia gênica.

[0031] A Figura 2A é um modelo de um capsídeo viral de AAV.

[0032] A Figura 2B é uma representação esquemática das proteínas do capsídeo viral de um sorotipo de AAV e suas massas aproximadas.

[0033] A Figura 3A é um traço de UV de uma separação de TIC de fase reversa de proteínas do capsídeo de AAV de uma partícula de AAV mostrando resolução pobre das proteínas individuais.

[0034] A Figura 3B é uma comparação de vários métodos de separação da técnica anterior mostrando uma resolução pobre e/ou quantificação pobre.

[0035] A Figura 4 é um traço de UV de uma separação por cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) de proteínas do capsídeo de AAV de uma partícula de AAV mostrando alta resolução das proteínas individuais e a determinação da abundância relativa das proteínas individuais.

[0036] As Figuras 5A-5D são espectros de massa de proteínas de capsídeo de AAV de uma partícula de AAV.

[0037] A Figura 6 mostra dois traços de análise HILIC-UV de partículas virais AAV9 e sua determinação estequiométrica.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0038] Antes da presente invenção ser descrita, deve-se entender que esta invenção não está limitada a métodos em particular e a condições experimentais descritas, uma vez que tais métodos e condições podem variar. Também se deve entender que a terminologia usada neste documento tem a finalidade de descrever somente modalidades em particular, e não se destina a ser limitante, uma vez que o escopo da presente invenção será limitado somente pelas reivindicações em anexo. Quaisquer modalidades ou características das modalidades podem ser combinadas umas com as outras, e tais combinações são expressamente englobadas no escopo da presente

invenção.

[0039] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado conforme comumente entendido por alguém versado na técnica à qual esta invenção pertence. Conforme utilizado neste documento, o termo "cerca de," quando utilizado em referência a um valor numérico recitado em particular, significa que o valor pode variar do valor recitado em não mais do que 1%. Por exemplo, conforme utilizado neste documento, a expressão "cerca de 100" inclui 99 e 101 e todos os valores neste intervalo (*por exemplo*, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, etc.).

[0040] Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles descritos neste documento possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, os métodos e materiais preferenciais são agora descritos. Todas as patentes, pedidos e publicações não patentárias mencionados neste relatório descritivo são incorporados neste documento por referência em suas totalidades.

Abreviações Utilizadas Neste Documento

[0041] MS/MS: Espectrometria de Massa em Tandem

[0042] MS: Espectrometria de Massa

[0043] ITRs: Sequências de Repetição de Terminal Invertido

[0044] Vetor de rAAV: Vetor de AAV Recombinante

[0045] HILIC: Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica

[0046] GAA: Alfa Glucosidase Lisossomal

[0047] mAb: Anticorpo Monoclonal

[0048] IgG: imunoglobulina G

[0049] LC: cadeia leve

[0050] HC: Cadeia Pesada

[0051] AAV: Vírus Adenoassociado

[0052] PTMs: Modificações Pós-Traducionais

[0053] ERT: Terapia de Reposição Enzimática

Definições

[0054] “Vírus adenoassociado” ou “AAV”: AAV é um parvovírus não patogênico, com DNA de fita simples, genoma de aproximadamente 4,7 kb, sem envelope e conformação icosaédrica. O AAV foi descoberto pela primeira vez em 1965 como um contaminante de preparações de adenovírus. O AAV pertence ao gênero *Dependovirus* e à família Parvoviridae, requerendo funções auxiliares do vírus do herpes ou do adenovírus para a replicação. Na ausência do vírus auxiliar, o AAV pode estabelecer latência integrando-se ao cromossomo humano 19 no local 19q13.4. O genoma de AAV consiste em dois quadros de leitura abertos (ORF), um para cada um dos dois genes de AAV, Rep e Cap. As extremidades do DNA de AAV têm uma repetição terminal invertida de 145 pb (ITR), e as 125 bases terminais são palindrômicas, levando a uma estrutura em hairpin em forma de T característica.

[0055] O gene Rep é transcrito dos promotores p5 e p19 em quatro proteínas Rep (Rep78, Rep68, Rep52 e Rep40), que têm papéis importantes no ciclo de vida do vírus. As proteínas Rep78 e Rep68 são codificadas pelo mRNA transcrito do promotor p5. Essas proteínas são essenciais para a replicação do DNA viral, transcrição e controle da integração sítio específica. As duas proteínas menores Rep52 e Rep40 são geradas pelo mRNA transcrito do promotor p19. Essas proteínas estão envolvidas na formação de um genoma viral de fita simples para empacotamento e integração viral. O gene Cap codifica três proteínas do capsídeo viral: VP1 (735 aminoácidos, ~90 kDa), VP2 (598 aminoácidos, ~72 kDa) e VP3 (533 aminoácidos, ~60 kDa), que formam o capsídeo viral de 60 subunidades, na razão de 1:1:10 (ver Figuras 2A e 2B). As três proteínas do capsídeo são traduzidas do mRNA transcrito do promotor p40.

[0056] O termo "anticorpo", conforme utilizado neste documento, pretende se referir a moléculas de imunoglobulina constituídas por

quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações dissulfeto (*isto é*, "moléculas de anticorpo completo"), bem como multímeros destas (*por exemplo* IgM) ou fragmentos de ligação ao antígeno destas. Cada cadeia pesada é constituída por uma região variável da cadeia pesada ("HCVR" ou "V_H") e uma região constante da cadeia pesada (compreendida pelos domínios C_H1, C_H2 e C_H3). Em várias modalidades, a cadeia pesada pode ser um isótipo de IgG. Em alguns casos, a cadeia pesada é selecionada de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em algumas modalidades, a cadeia pesada é do isótipo de IgG1 ou IgG4, opcionalmente incluindo uma região de dobradiça quimérica do isótipo de IgG1/IgG2 ou IgG4/IgG2. Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve ("LCVR ou "V_L") e uma região constante da cadeia leve (C_L). As regiões V_H e V_L podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinanetes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de framework (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, arranjadas da extremidade amino terminal até a extremidade carbóxi terminal na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. O termo "anticorpo" inclui referência a imunoglobulinas glicosiladas e não glicosiladas de qualquer isótipo ou subclasse. O termo "anticorpo" inclui moléculas de anticorpo preparadas, expressas, criadas ou isoladas por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de uma célula hospedeira transfectada para expressar o anticorpo. Para uma revisão sobre a estrutura do anticorpo, consulte Lefranc *et al*., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,* 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003); e M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity,* 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

[0057] O termo anticorpo também abrange "anticorpo biespecífico", que inclui uma imunoglobulina heterotetramérica que pode se ligar a mais de um epítopo diferente. Metade do anticorpo biespecífico, que inclui uma única cadeia pesada e uma única cadeia leve e seis CDRs, se liga a um antígeno ou epítopo, e a outra metade do anticorpo se liga a um antígeno ou epítopo diferente. Em alguns casos, o anticorpo biespecífico pode se ligar ao mesmo antígeno, mas em diferentes epítopos ou epítopos não sobrepostos. Em alguns casos, ambas as metades do anticorpo biespecífico têm cadeias leves idênticas, mantendo a especificidade dupla. Os anticorpos biespecíficos são descritos geralmente na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2010/0331527 (30 de dezembro de 2010).

[0058] O termo "porção de ligação ao antígeno" e "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo (ou "fragmento de anticorpo"), refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retém a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno. Exemplos de fragmentos de ligação englobados no termo "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')2, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al*., Nature (1989) 241:544-546), que consiste em um domínio VH, (vi) uma CDR isolada e (vii) um scFv, que consiste nos dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, unidos por um ligante sintético para formar uma única cadeia proteica na qual as regiões VL e VH se pareiam para formar moléculas monovalentes. Outras formas de anticorpos de cadeia única, como diacorpos, também estão abrangidas pelo termo "anticorpo" (ver, por

exemplo, Holliger *et al*. (1993) 90 PNAS EUA 6444-6448; e Poljak *et al*. (1994) 2 Estrutura 1121-1123).

[0059] Além disso, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno destes podem ser obtidos usando técnicas de DNA recombinante padrão comumente conhecidas na técnica (ver Sambrook *et al*., 1989).

[0060] O termo "anticorpo humano" pretende incluir anticorpos que têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinativa humana. Os mAbs humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese randômica ou sítio específica in vitro ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo nas CDRs e, em particular, CDR3. No entanto, o termo "anticorpo humano", conforme usado neste documento, não se destina a incluir mAbs nos quais as sequências CDR derivadas da linhagem germinativa de outra espécie de mamífero (tal como um camundongo) foram enxertadas em sequências FR humanas. O termo inclui anticorpos produzidos de forma recombinante em um mamífero não humano ou em células de um mamífero não humano. O termo não se destina a incluir anticorpos isolados ou gerados em um indivíduo humano.

[0061] O termo "correspondente" é um termo relativo que indica semelhança na posição, finalidade ou estrutura. Um sinal espectral de massa devido a um determinado peptídeo ou proteína também é referido como um sinal correspondente ao peptídeo ou proteína. Em certas modalidades, uma sequência peptídica particular ou conjunto de aminoácidos, como uma proteína, pode ser atribuído a uma massa de peptídeo correspondente.

[0062] O termo "isolado", conforme utilizado neste documento, refere-se a um componente biológico (tal como um ácido nucleico,

peptídeo, proteína, lipídeo, partícula viral ou metabólito) que foi substancialmente separado, produzido separadamente ou purificado de outros componentes biológicos na célula do organismo em que o componente ocorre naturalmente ou é expresso transgenicamente.

[0063] "Espectrometria de massa" é um método em que uma amostra é analisada gerando íons de fase gasosa da amostra, que são então separados de acordo com sua razão massa carga (m/z) e detectados. Os métodos de geração de íons de fase gasosa a partir de uma amostra incluem ionização por eletropulverização (ESI), dessorção-ionização a laser assistida por matriz (MALDI), dessorção-ionização a laser aprimorada por superfície (SELDI), ionização química e ionização por impacto de elétrons (EI). A separação de íons de acordo com sua razão m/z pode ser realizada com qualquer tipo de analisador de massa, incluindo analisadores de massa quadrupolo (Q), analisadores de massa de tempo de voo (TOF), analisadores de massa de setor magnético, armadilhas de íons lineares e 3D (IT), analisador de massa orbitrap, analisadores de ressonância cíclotron iônica com transformada de Fourier (FT-ICR) e suas combinações (por exemplo, um analisador quadrupolo-tempo de voo ou analisador Q-TOF). Antes da separação, a amostra pode ser submetida a uma ou mais dimensões de separação cromatográfica, por exemplo HILIC.

[0064] A espectrometria de massa em tandem ou MS/MS é uma técnica para quebrar íons selecionados (íons precursores) em fragmentos (íons produto). Os fragmentos então divulgam aspectos da estrutura química do íon precursor. Em espectrometria de massa em tandem, uma vez que as amostras são ionizadas (por exemplo, por ESI, MALDI, EI, etc.) para gerar uma mistura de íons, íons precursores, por exemplo, peptídeos de uma digestão, de uma razão massa-carga específica (*m/z*) são selecionados (MS1) e, em seguida, fragmentados (MS2) para gerar íons de produto para detecção. Os instrumentos de

MS em tandem típicos incluem QqQ, QTOF e armadilha de íons híbrida/FTMS, etc. Um exemplo de uma aplicação de espectrometria de massa em tandem é a identificação de proteínas. O primeiro analisador de massa isola íons de um valor *m/z* específico que representa uma única espécie de peptídeo entre muitas introduzidas e emergentes da fonte de íons. Esses íons são então acelerados em uma célula de colisão contendo um gás inerte, como o argônio, para induzir a fragmentação do íon. Este processo é denominado dissociação induzida por colisão (CID) ou dissociação ativada por colisão (CAD). Os valores m/z dos íons do fragmento são então medidos em um 2º analisador de massa para obter informações da sequência de aminoácidos. A espectrometria de massa em tandem pode ser usada para identificar a sequência de um peptídeo e, portanto, proteínas de comprimento total ou parcial de acordo com os métodos divulgados neste documento. Os íons precursores podem ser ativados (com aumento da energia interna) de muitas maneiras diferentes. Os padrões de fragmentação dependem de como a energia é transferida para o íon precursor, da quantidade de energia transferida e de como a energia transferida é distribuída internamente. A dissociação induzida por colisão e a dissociação multifotônica infravermelha são técnicas de "aquecimento lento" que aumentam a temperatura de Boltzmann do íon e, portanto, clivam preferencialmente as ligações mais fracas.

[0065] Os termos "peptídeo", "proteína" e "polipeptídeo" referem-se, indistintamente, a um polímero de aminoácidos e/ou análogos de aminoácidos que são unidos por ligações peptídicas ou miméticos de ligação peptídica. Os vinte aminoácidos de ocorrência natural e suas designações de uma e três letras são os seguintes: Alanina A Ala; Cisteína C Cys; Ácido Aspártico D Asp; Ácido glutâmico E Glu; Fenilalanina F Phe; Glycine G Gly; Histidina H His; Isoleucina I He; Lisina K Lys; Leucina L Leu; Metionina M Met; Asparagina N Asn;

Proline P Pro; Glutamina Q Gln; Arginina R Arg; Serina S Ser; Treonina T Thr; Valine V Val; Triptofano w Trp; e Tirosina Y Tyr.

[0066] As referências a uma massa de um aminoácido significam a massa monoisotópica ou massa média de um aminoácido em uma dada abundância isotópica, como uma abundância natural. Em alguns exemplos, a massa de um aminoácido pode ser distorcida, por exemplo, marcando um aminoácido com um isótopo. Algum grau de variabilidade em torno da massa média de um aminoácido é esperado para aminoácidos individuais com base na composição isotópica exata do aminoácido. As massas, incluindo as massas monoisotópicas e médias dos aminoácidos, são facilmente obtidas por um versado na técnica.

[0067] Da mesma forma, as referências a uma massa de um peptídeo ou proteína significam a massa monoisotópica ou massa média de um peptídeo ou proteína em uma dada abundância isotópica, tal como uma abundância natural. Em alguns exemplos, a massa de um peptídeo pode ser distorcida, por exemplo, marcando um ou mais aminoácidos no peptídeo ou proteína com um isótopo. Algum grau de variabilidade em torno da massa média de um peptídeo é esperado para peptídeos individuais com base na composição isotópica exata do peptídeo. A massa de um determinado peptídeo pode ser determinada por um versado na técnica.

[0068] Um "vetor", conforme utilizado neste documento, refere-se a um plasmídeo ou vírus recombinante que compreende um ácido nucleico a ser entregue em uma célula hospedeira, *in vitro* ou *in vivo*.

[0069] O termo "polinucleotídeo" ou "ácido nucleico", conforme utilizado neste documento, refere-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, tanto ribonucleotídeos quanto desoxirribonucleotídeos. Assim, esse termo inclui, mas não se limita a, DNA ou RNA de fita simples, dupla ou múltiplas, DNA genômico, cDNA, híbridos de DNA-RNA ou um polímero compreendendo bases de purina

e pirimidina ou outras bases nucleotídicas naturais, quimicamente ou bioquimicamente modificadas, não naturais ou derivatizadas. A cadeia principal do ácido nucleico pode compreender açúcares e grupos fosfato (como pode ser tipicamente encontrado no RNA ou DNA), ou açúcar modificado ou substituído ou grupos fosfato.

[0070] Alternativamente, a cadeia principal do ácido nucleico pode compreender um polímero de subunidades sintéticas, como fosforamidatos e, portanto, pode ser um fosforamidato de oligodesoxinucleosídeo (P-NH2) ou um oligômero de fosforamidato-fosfodiéster misto. Além disso, um ácido nucleico de fita dupla pode ser obtido a partir do produto polinucleotídico de fita simples da síntese química, quer sintetizando a fita complementar e emparelhando as fitas sob condições apropriadas, ou sintetizando a fita complementar de novo usando uma DNA polimerase com um primer.

[0071] Um "vetor viral recombinante" refere-se a um vetor polinucleotídico recombinante incluindo uma ou mais sequências heterólogas (isto é, sequência de ácido nucleico de origem não viral).

[0072] Um "vetor de AAV recombinante (vetor de rAAV)" refere-se a um vetor polinucleotídico incluindo uma ou mais sequências heterólogas (isto é, sequência de ácido nucleico de origem não de AAV) que pode ser flanqueada por pelo menos uma, por exemplo, duas, sequências de repetição terminal invertida de AAV (ITRs). Esses vetores de rAAV podem ser replicados e empacotados em partículas virais infecciosas quando presentes em uma célula hospedeira que foi infectada com um vírus auxiliar adequado (ou que está expressando funções auxiliares adequadas) e que está expressando produtos de gene rep e cap de AAV (isto é, proteínas Rep e Cap de AAV).

[0073] Uma "partícula viral" refere-se a uma partícula viral composta de pelo menos uma proteína do capsídeo viral e um genoma viral encapsulado.

[0074] "Heterólogo" significa derivado de uma entidade genotipicamente distinta daquela do resto da entidade com a qual é comparada ou na qual é introduzida ou incorporada. Por exemplo, um ácido nucleico introduzido por técnicas de engenharia genética em um tipo de célula diferente é um polinucleotídeo heterólogo (e, quando expresso, pode codificar um polipeptídeo heterólogo). De modo semelhante, uma sequência celular (por exemplo, um gene ou uma porção deste) que é incorporada a um vetor viral é uma sequência nucleotídica heteróloga em relação ao vetor.

[0075] Uma sequência de "repetição terminal invertida" ou "ITR" são sequências relativamente curtas encontradas nos terminais dos genomas virais que estão em orientação oposta. Uma sequência de "repetição terminal invertida (ITR) de AAV" é uma sequência de aproximadamente 145 nucleotídeos que está presente em ambos os terminais de um genoma de AAV de fita simples.

[0076] O termo "cromatografia de interação hidrofílica" ou HILIC se destina a incluir um processo que usa uma fase estacionária hidrofílica e uma fase móvel orgânica hidrofóbica na qual os compostos hidrofílicos são retidos por mais tempo do que os compostos hidrofóbicos. Em certas modalidades, o processo utiliza uma fase móvel solvente miscível em água.

[0077] O termo "amostra", conforme utilizado neste documento, refere-se a uma mistura de moléculas que compreende pelo menos uma partícula viral, como uma partícula de AAV, que é submetida à manipulação de acordo com os métodos da invenção, incluindo, por exemplo, separando, analisando, extraindo, concentrando, perfilando e semelhantes.

[0078] O termo "superfície cromatográfica", conforme utilizado neste documento, inclui uma superfície que é exposta a uma amostra ou analitos. Uma superfície cromatográfica pode ser quimicamente

modificada, funcionalizada ou ativada ou ter uma microestrutura, por exemplo, um poro. Em certas modalidades, a superfície cromatográfica pode ser hidrofóbica, hidrofílica (polar) ou iônica. Em outras modalidades, a superfície cromatográfica é totalmente porosa, superficialmente porosa ou não porosa.

[0079] O termo "núcleo cromatográfico", conforme utilizado neste documento, inclui um material cromatográfico, incluindo, mas não se limitando a um material orgânico, como sílica, na forma de uma partícula, um monólito ou outra estrutura adequada que forma uma porção interna dos materiais da invenção. Em certos aspectos, a superfície do núcleo cromatográfico representa a superfície cromatográfica ou representa um material enclausurado por uma superfície cromatográfica, conforme definido neste documento. O material da superfície cromatográfica pode ser disposto ou ligado ou anelado ao núcleo cromatográfico de tal forma que uma transição discreta ou distinta seja discernível ou pode ser ligado ao núcleo cromatográfico de modo a se misturar com a superfície do núcleo cromatográfico resultando em uma gradação de materiais e nenhuma superfície interna discreta do núcleo. Em certos aspectos, o material da superfície cromatográfica pode ser o mesmo ou diferente do material do núcleo cromatográfico e pode exibir diferentes propriedades físicas ou físico-químicas do núcleo cromatográfico, incluindo, mas não se limitando a, volume de poro, área de superfície, diâmetro médio dos poros, teor de carbono ou estabilidade do pH hidrolítico.

[0080] O termo "hidrofílico", como utilizado neste documento, descreve ter uma afinidade por, atrair, adsorver ou absorver água.

[0081] O termo "hidrofóbico", conforme utilizado neste documento, descreve a falta de afinidade, repele ou falha em adsorver ou absorver água.

[0082] "Cromatografia", conforme utilizado neste documento,

refere-se ao processo de separação de uma mistura, por exemplo, uma mistura contendo proteínas do capsídeo viral. Envolve a passagem de uma mistura por uma fase estacionária, que separa as moléculas de interesse de outras moléculas na mistura e permite que uma ou mais moléculas de interesse sejam isoladas. Um exemplo de um método de separação cromatográfica é a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC).

[0083] "Contato", conforme utilizado neste documento, inclui reunir pelo menos duas substâncias em solução ou fase sólida, por exemplo, contatar uma fase estacionária de um material de cromatografia com uma amostra, como uma amostra compreendendo partículas virais.

Descrição Geral

[0084] A doença de Pompe é um distúrbio de armazenamento lisossomal autossômico recessivo causado por mutações no gene GAA que codifica α-glucosidase ácida (GAA) - uma enzima lisossomal responsável pela hidrólise do glicogênio em glicose. A deficiência de GAA resulta no acúmulo de glicogênio nos lisossomas e subsequente disfunção celular nos músculos cardíacos, esqueléticos e lisos, bem como no sistema nervoso central. A doença de Pompe pode se apresentar no início da vida como doença de Pompe de início infantil (IOPD) ou mais tarde na infância até a idade adulta como doença de Pompe de início tardio (LOPD). A insuficiência respiratória é uma causa importante de morte em ambos os tipos de doença de Pompe.

[0085] Atualmente, o único tratamento aprovado pela Food and Drug Administration para a doença de Pompe é a terapia de reposição enzimática (TRE). No entanto, o GAA administrado sistemicamente não atravessa a barreira hematoencefálica e, portanto, não pode tratar a patologia do SNC e os neurônios motores respiratórios afetados. Além disso, a ERT corrige apenas parcialmente as anormalidades do músculo esquelético como resultado da baixa captação nas fibras musculares.

Consequentemente, dois terços dos pacientes com IOPD eventualmente requerem suporte ventilatório, e a insuficiência respiratória persiste entre os pacientes com LOPD

[0086] A terapia gênica usando vetores de vírus adeno-associados (AAV) é ideal para a doença de Pompe, uma vez que é uma doença monogenética. Uma das estratégias que está sendo estudada é a combinação de reposição enzimática com anticorpos ligados. Em um exemplo, a alta expressão de anti-CD63::GAA do fígado por meio de terapia gênica está sendo desenvolvida para superar a resposta imune à enzima de substituição observada em pacientes sem enzima endógena (ver Figura 1). Tal como acontece com todos os sistemas de vetores virais, é importante garantir que a composição terapêutica contenha a quantidade certa de partículas virais formadas corretamente. Assim, determinar a estequiometria e a composição proteica das partículas virais é muito importante

[0087] Aspectos desta divulgação são direcionados a um método para determinar a estequiometria de componentes de proteína de um capsídeo viral de uma partícula viral. Em modalidades, o método inclui a sujeição de uma amostra de partículas virais a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) para separar os componentes da proteína do capsídeo viral das partículas virais, como partículas virais de interesse onde a informação sobre o capsídeo é desejada. Nas modalidades, uma coluna HILIC é colocada em contato com a amostra contendo as partículas virais. Em certas modalidades, o método inclui a determinação das massas dos componentes da proteína do capsídeo viral para identificar os componentes da proteína separados por HILIC, por exemplo, usando técnicas de espectrometria de massa, tais como aquelas descritas neste documento. Em modalidades, o método inclui o cálculo da abundância relativa dos componentes da proteína do capsídeo viral da separação HILIC para determinar a estequiometria dos

componentes da proteína de um capsídeo viral de uma partícula viral, por exemplo, usando detecção ultravioleta (UV) dos componentes da proteína do capsídeo viral à medida que são eluídos da coluna HILIC. Por exemplo, a área de um pico de UV pode ser usada para determinar a abundância relativa das proteínas do capsídeo e usada para calcular a estequiometria das proteínas do capsídeo no capsídeo vital (ver, Figura 4). Em outro exemplo, a altura do pico e/ou a intensidade do pico de UV é usada para determinar a abundância relativa. Em algumas modalidades, o tempo de retenção das diferentes proteínas na coluna HILIC é determinado em função da fase móvel usada e, em análises subsequentes, este tempo de retenção pode ser usado para determinar as proteínas e a abundância relativa das proteínas da partícula viral sem a necessidade de determinar a massa e ou identidade das proteínas cada vez que uma determinação de estequiometria é feita, por exemplo, um valor ou valores padrão podem ser desenvolvidos. Antes desta divulgação, era muito difícil resolver as diferentes proteínas da cápside usando técnicas convencionais de cromatografia (ver Figuras 3A e 3B). Usando as condições de amostra discutidas neste documento para HILIC, uma boa separação foi alcançada para partículas virais de AAV. Além disso, o uso da coluna HILIC removeu qualquer requisito para uma etapa de desnaturação. Em certas modalidades, o método é usado para determinar o serotipo de uma partícula viral. Por exemplo, as massas de VP 1, VP2 e VP3 de cada serotipo de AAV são únicas e podem ser usadas para identificar ou diferenciar serotipos de capsídeo de AAV. Além disso, as proteínas do capsídeo separadas podem ser submetidas a análise a jusante, como uma determinação da sequência da proteína e modificações pós-tradução das proteínas do capsídeo, por exemplo, com medição de massa precisa no nível da proteína intacta.

[0088] Aspectos desta divulgação são direcionados a um método para determinar a heterogeneidade de componentes de proteína em um

capsídeo viral de uma partícula viral. Em modalidades, o método inclui submeter a partícula viral a HILIC para separar componentes de proteína do capsídeo da partícula viral. Em modalidades, o método inclui determinar as massas dos componentes da proteína do capsídeo da proteína. Em alguns casos, as massas dos componentes da proteína do capsídeo da partícula viral são comparadas com as massas teóricas do capsídeo da partícula viral. Um desvio de uma ou mais das massas dos componentes da proteína do capsídeo da partícula viral indica que uma ou mais proteínas do capsídeo são heterogêneas (ver Figura 5A). Por outro lado, nenhum desvio indicaria que as proteínas do capsídeo são homogêneas (ver Figura. 5B-5D). Em algumas modalidades, a heterogeneidade compreende um ou mais dos serotipos mistos, capsídeos variantes, substituições de aminoácidos do capsídeo, capsídeos truncados ou capsídeos modificados. Em algumas modalidades, a determinação da estequiometria dos componentes da proteína de um capsídeo viral de uma partícula viral e a determinação da heterogeneidade dos componentes da proteína em um capsídeo de uma partícula viral são feitas na mesma amostra, por exemplo, é um único teste.

[0089] Em certas modalidades, a partícula viral é uma partícula de vírus adeno-associado (AAV) e os métodos divulgados podem ser usados para determinar a estequiometria de componentes de proteína em um capsídeo de uma partícula de AAV e/ou heterogeneidade de componentes de proteína em um capsídeo de uma partícula de AAV. Em algumas modalidades, os componentes da proteína do capsídeo viral compreendem VP1, VP2 e VP3 da partícula de AAV. Em algumas modalidades, a partícula de AAV é uma partícula de AAV recombinante (rAAV). Em algumas modalidades, a partícula de AAV compreende um vetor de AAV que codifica um transgene heterólogo. Em algumas modalidades, uma massa determinada ou calculada da presente

divulgação (por exemplo, a massa determinada ou calculada de VP1, VP2 e/ou VP3 da partícula de AAV) pode ser comparada com uma referência, por exemplo, uma massa teórica de um VP1, VP2 e/ou VP3 de um ou mais serotipos de AAV (ver, por exemplo, Figuras 2A e 2B). Uma referência pode incluir uma massa teórica de um VP1, VP2 e/ou VP3 de um ou mais de qualquer um dos serotipos de AAV. Por exemplo, em algumas modalidades, as massas de VP1, VP2 e VP3 são comparadas às massas teóricas de um ou mais de um capsídeo AAV1, um capsídeo AAV2, um capsídeo AAV3, um capsídeo AAV4, um capsídeo AAV5, um capsídeo AAV6, um capsídeo AAV7, um capsídeo AAV8, um capsídeo AAVrh8, um capsídeo AAV9, um capsídeo AAV10, um capsídeo AAV11, um capsídeo AAV 12 ou uma variante destes. Em algumas modalidades, uma massa determinada ou calculada (por exemplo, a massa determinada ou calculada de VP1, VP2 e/ou VP3 da partícula de AAV) pode ser comparada com uma massa teórica de um VP1, VP2 e/ou VP3 do serotipo de AAV correspondente.

[0090] Em algumas modalidades, os métodos da presente divulgação podem incluir a determinação da heterogeneidade das proteínas de uma partícula de AAV. Em algumas modalidades, um desvio de uma ou mais das massas de VP1, VP2 e/ou VP3 (por exemplo, de uma massa de referência, tal como uma massa teórica, prevista ou esperada) é indicativo da heterogeneidade da proteína do capsídeo de AAV. Em algumas modalidades, a heterogeneidade pode incluir um ou mais dos seguintes, sem limitação: serotipos mistos, cápsides variantes, substituições de aminoácidos da capsídeo, capsídeos truncados ou capsídeos modificados.

[0091] Em algumas modalidades, um método para determinar a heterogeneidade de uma partícula de AAV pode incluir submeter uma partícula AAV desnaturada a LC/MS (por exemplo, conforme descrito neste documento), determinar as massas de VP1, VP2 e VP3 da

partícula de AAV e compará-las massas com massas teóricas de VP1, VP2 e VP3 do serotipo AAV; bem como submeter fragmentos de VP1, VP2 e/ou VP3 a LC/MS/MS, determinar as massas dos fragmentos de VP1, VP2 e VP3 da partícula de AAV e comparar essas massas com as massas teóricas de VP1, VP2 e VP3 de o sorotipo AAV (um desvio de uma ou mais das massas de VP1, VP2 ou VP3 são indicativos da heterogeneidade do capsídeo de AAV).

[0092] Em algumas modalidades, a partícula de AAV compreende um capsídeo de AAV1, um capsídeo de AAV2, um capsídeo de AAV3, um capsídeo de AAV4, um capsídeo de AAV5, um capsídeo de AAV6, um capsídeo de AAV7, um capsídeo de AAV8, um capsídeo de AAVrh8, um capsídeo de AAV9, um capsídeo de AAV10, um capsídeo de AAV11, um capsídeo de AAV 12 ou uma variante destes.

[0093] Em algumas modalidades, as massas de VP1, VP2 e VP3 são comparadas às massas teóricas de um ou mais de um capsídeo de AAV1, um capsídeo de AAV2, um capsídeo de AAV3, um capsídeo de AAV4, um capsídeo de AAV5, um capsídeo de AAV6, um capsídeo de AAV7, um capsídeo de AAV8, um capsídeo de AAVrh8, um capsídeo de AAV9, um capsídeo de AAV10, um capsídeo de AAV11, um capsídeo de AAV 12 ou uma variante destes.

[0094] Em algumas modalidades, a partícula de AAV compreende uma sequência de repetição terminal invertida de AAV1 (ITR), uma AAV2 ITR, uma AAV3 ITR, uma AAV4 ITR, uma AAV5 ITR, uma AAV6 ITR, uma AAV7 ITR, uma AAV8 ITR, uma AAVrh8 ITR, uma AAV9 ITR, uma AAV 10 ITR, uma AAV11 ITR ou uma AAV12 ITR.

[0095] Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo selecionado para transdução de células do fígado de um indivíduo. Em modalidades, a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo AAV7, AAV8 ou AAV9, que são seletivos para a transdução de células do fígado de um indivíduo.

[0096] Em algumas modalidades, a partícula de AAV é uma partícula de AAV recombinante (rAAV). Em algumas modalidades, a partícula de AAV compreende um vetor de AAV que codifica um transgene heterólogo. Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo de AAV7, AAV8 ou AAV9. Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um sorotipo de capsídeo AAV9. Em algumas modalidades, a partícula de AAV tem um sorotipo de capsídeo AAV9 e é um vetor viral que codifica a Alfa Glucosidase Lisossomal (GAA) ligado a um anticorpo específico para um antígeno expresso a partir de uma célula muscular (por exemplo, um anticorpo anti-CD63).

[0097] Embora AAV tenha sido a partícula viral modelo para esta divulgação, é contemplado que os métodos divulgados podem ser aplicados para traçar o perfil de uma variedade de vírus, por exemplo, as famílias, subfamílias e gêneros virais. Os métodos da presente divulgação podem encontrar uso, por exemplo, no perfil de VPs para monitorar expressões de VP, modificações pós-traducionais e truncamentos e para garantir a consistência do produto durante a produção de VLP, para confirmar mutagênese direta ao sítio ou caracterização estrutural para aplicações de engenharia de proteína de capsídeo, e/ou para monitorar ou detectar a heterogeneidade de uma partícula ou preparação viral.

[0098] Em modalidades, o vetor viral codifica um transgene heterólogo.

[0099] Em modalidades, a partícula viral pertence a uma família viral selecionada do grupo que consiste em Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae e Herpesviridae.

[00100] Em algumas modalidades, a partícula viral pertence a um gênero viral selecionado a partir do grupo que consiste em Atadenovirus, Aviadenovirus, Ictadenovirus, Mastadenovirus,

Siadenovirus, Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepandensovirus, Iteradensovirus, Penstyldensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Eritroparvovirus, Protoparvovirus, Tetraparvovirus, Alfaretrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus, Lentivirus, Spumavirus, Alfabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus, Gammabaculovirus, Iltovirus, Mardivirus, Simplexvirus, Varicellovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus, Roseolovirus, Linfocriptovirus, Macavirus, Percavirus, e Rhadinovirus.

[00101] Em algumas modalidades, o Retroviridae é o vírus do sarcoma murino Moloney (MoMSV), vírus do sarcoma murino Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário murino (MuMTV), vírus da leucemia do macaco gibão (GaLV), vírus da leucemia felina (FLV), spumavírus, vírus Friend, vírus da célula-tronco murina (MSCV), vírus Rous Sarcoma (RSV), vírus da leucemia de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da imunodeficiência equina (EIV), vírus visna-maedi; vírus da artrite-encefalite caprina; vírus da anemia infecciosa equina; vírus da imunodeficiência felina (FIV); vírus da imunodeficiência bovina (BIV); ou vírus da imunodeficiência símia (SIV).

[00102] A cromatografia de interação hidrofílica (HILIC) é uma variante do NP-HPLC que pode ser realizada com fases móveis parcialmente aquosas, permitindo a separação de fase normal de peptídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e muitas proteínas. A ordem de eluição para HILIC é do menos polar para o mais polar, o oposto daquele em HPLC de fase reversa.

[00103] HILIC separa analitos com base nas interações polares entre os analitos e a fase estacionária (por exemplo, substrato). O analito polar associa-se e é retido pela fase estacionária polar. As resistências de adsorção aumentam com o aumento da polaridade do analito, e a

interação entre o analito polar e a fase estacionária polar (em relação à fase móvel) aumenta o tempo de eluição. O uso de solventes mais polares na fase móvel diminuirá o tempo de retenção dos analitos, enquanto os solventes mais hidrofóbicos tendem a aumentar os tempos de retenção.

[00104] Vários tipos de substratos podem ser usados com HILIC, por exemplo, para cromatografia em coluna, incluindo substratos de sílica, amino, amida, celulose, ciclodextrina e poliestireno. Exemplos de substratos úteis, por exemplo, que podem ser usados em cromatografia em coluna, incluem: polissulfoetil aspartamida (por exemplo, de PolyLC), um substrato de sulfobetaína, por exemplo, ZIC®-HILIC (por exemplo, de SeQuant), POROS® HS (por exemplo, de Applied Biosystems), POROS® S (por exemplo, da Applied Biosystems), Poli-hidroetil aspartamida (por exemplo, da PolyLC), Zorbax 300 SCX (por exemplo, da Agilent), PolyGLYCOPLEX® (por exemplo, da PolyLC), Amida-80 (por exemplo, da Tosohaas), TSK GEL® Amide-80 (por exemplo, de Tosohaas), Poli-hidroxietil A (por exemplo, de PolyLC), Glyco-Sep-N (por exemplo, de Oxford GlycoSciences) e Atlantis HILIC (por exemplo, de Waters). As colunas que podem ser usadas nos métodos divulgados incluem colunas que utilizam um ou mais dos seguintes grupos funcionais: grupos carbamoila, grupos sulfopropila, grupos sulfoetila (por exemplo, poli (2-sulfoetil aspartamida)), grupos hidroxietila (por exemplo, poli (2-hidroxietil aspartamida)) e grupos de ácido sulfônico aromático.

[00105] Em certas modalidades, as proteínas do capsídeo são separadas na coluna HILIC e, subsequentemente, eluídas da coluna HILIC, por exemplo, usando um gradiente de fase móvel para resolver as proteínas do capsídeo individuais, purificando e/ou separando as proteínas do capsídeo na amostra. Em certos exemplos, as proteínas de capsídeo eluídas da coluna HILIC são separadas em uma ou mais

frações. Essas frações podem ser usadas para análises subsequentes, como a análise de MS. Em certas modalidades, os métodos incluem a identificação de proteínas do capsídeo presentes em uma ou mais das frações.

[00106] A fase móvel usada pode incluir tampões com e sem agentes de emparelhamento de íons, por exemplo, acetonitrila e água. Os agentes de emparelhamento iônico incluem formiato, acetato, TFA e sais. Os gradientes dos tampões podem ser usados, por exemplo, se dois tampões são usados, a concentração ou porcentagem do primeiro tampão pode diminuir enquanto a concentração ou porcentagem do segundo tampão aumenta ao longo da execução da cromatografia. Por exemplo, a porcentagem do primeiro tampão pode diminuir de cerca de 100%, cerca de 99%, cerca de 95%, cerca de 90%, cerca de 85%, cerca de 80%, cerca de 75%, cerca de 70%, cerca de 65%, cerca de 60%, cerca de 50%, cerca de 45% ou cerca de 40% a cerca de 0%, cerca de 1%, cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35%, ou cerca de 40% ao longo da execução da cromatografia. Como outro exemplo, a porcentagem do segundo tampão pode aumentar de cerca de 0%, cerca de 1%, cerca de 5%, cerca de 10%, cerca de 15%, cerca de 20%, cerca de 25%, cerca de 30%, cerca de 35% ou cerca de 40% a cerca de 100%, cerca de 99%, cerca de 95%, cerca de 90%, cerca de 85%, cerca de 80%, cerca de 75%, cerca de 70%, cerca de 65%, cerca de 60%, cerca de 50%, cerca de 45%, ou cerca de 40% ao longo da mesma execução. Em modalidades, a proporção de fase móvel A na cromatografia aumenta ao longo do tempo. Opcionalmente, a concentração ou porcentagem do primeiro e do segundo tampão pode retornar aos seus valores iniciais no final da execução da cromatografia. Como um exemplo, a porcentagem do primeiro tampão pode mudar em cinco etapas de 85% a 63% a 59% a 10% a 85%; enquanto a porcentagem do segundo

tampão nas mesmas etapas muda de 15% a 37% a 41% a 90% a 15%. As porcentagens podem mudar gradualmente como um gradiente linear ou de forma não linear (por exemplo, passo a passo). Por exemplo, o gradiente pode ser multifásico, por exemplo, bifásico, trifásico, etc. Em modalidades preferidas, os métodos descritos neste documento usam um gradiente de tampão de acetonitrila decrescente que corresponde à polaridade crescente da fase móvel sem o uso de agentes de pareamento iônico. Em modalidades, o HILIC usa uma fase móvel A compreendendo ácido trifluoroacético em água. Em modalidades, a fase móvel A compreende cerca de 0,1% de ácido trifluoroacético. Em modalidades, a cromatografia compreende uma fase móvel B compreendendo ácido trifluoroacético em acetonitrila. Em modalidades, a fase móvel B compreende cerca de 0,1% de ácido trifluoroacético.

[00107] A temperatura da coluna pode ser mantida a uma temperatura constante ao longo de toda a execução da cromatografia, por exemplo, usando um aquecedor de coluna comercial. Em algumas modalidades, a coluna é mantida a uma temperatura entre cerca de 50°C a cerca de 70°C, *por exemplo*, cerca de 50°C a cerca de 60°C, cerca de 55°C a cerca de 60°C, *por exemplo*, a cerca de 50°C a cerca de 55°C, cerca de 60°C, cerca de 65°C ou cerca de 70°C. Em uma modalidade, a temperatura é de cerca de 60°C.

[00108] A taxa de fluxo da fase móvel pode estar entre cerca de 0 a cerca de 100 ml/min. Para fins analíticos, as taxas de fluxo variam normalmente de 0 a 10 ml/min, para HPLC preparativa, taxas de fluxo superiores a 100 ml/min podem ser usadas. Por exemplo, a taxa de fluxo pode ser cerca de 0,5, cerca de 1, cerca de 1,5, cerca de 2, cerca de 2,5, cerca de 3, cerca de 3,5, cerca de 4, cerca de 4,5 ou cerca de 5 ml/min. Substituir uma coluna com o mesmo empacotamento, o mesmo comprimento, mas um diâmetro menor requer uma redução na taxa de fluxo a fim de manter o mesmo tempo de retenção e resolução para

picos vistos com uma coluna de diâmetro maior. De preferência, uma taxa de fluxo equivalente a cerca de 1 ml/min em uma coluna de 4,6 x 100 mm, 5 µm é usada.

[00109] O tempo de execução pode ser entre cerca de 15 a cerca de 240 minutos, por exemplo, cerca de 20 a cerca de 70 min, cerca de 30 a cerca de 60 min, cerca de 40 a cerca de 90 min, cerca de 50 min a cerca de 100 min, cerca de 60 a cerca de 120 min, cerca de 50 a cerca de 80 min. Em modalidades, a fase móvel A aumenta de cerca de 15% a cerca de 100%, ao longo de cerca de 45 minutos.

[00110] Em algumas modalidades, os métodos incluem submeter uma partícula viral a cromatografia líquida/espectrometria de massa (LC/MS). Conforme é conhecido na técnica, LC/MS utiliza cromatografia líquida para separação física de íons e espectrometria de massa para geração de dados espectrais de massa a partir dos íons. Esses dados espectrais de massa podem ser usados para determinar, por exemplo, peso molecular ou estrutura, identificação de partículas por massa, quantidade, pureza e assim por diante. Esses dados podem representar propriedades dos íons detectados, como força do sinal (por exemplo, abundância) ao longo do tempo (por exemplo, tempo de retenção), ou abundância relativa sobre a razão massa-carga.

[00111] Em algumas modalidades, a espectrometria de massa (por exemplo, usada em LC/MS conforme descrito neste documento) pode se referir a espectrometria de massa de ionização por eletropulverização (ESI-MS). ESI-MS é conhecido na técnica como uma técnica que usa energia elétrica para analisar íons derivados de uma solução usando espectrometria de massa (ver, por exemplo, Yamashita, M. e Fenn, J.B. (1984). Phys. Chem. 88: 4451-4459). Espécies iônicas (ou espécies neutras que são ionizadas em solução ou em fase gasosa) são transferidas de uma solução para uma fase gasosa por dispersão em um aerossol de gotículas carregadas, seguido por evaporação de

solvente que reduz o tamanho das gotículas carregadas e ejeção do íon da amostra das gotículas de carga conforme a solução é passada através de um pequeno capilar com uma voltagem em relação à terra (por exemplo, a parede da câmara circundante ESI é realizada misturando a amostra com ácido volátil e solvente orgânico e infundindo-a através de uma agulha condutora carregada com alta tensão. As gotículas carregadas que são pulverizadas (ou ejetadas) da ponta da agulha são direcionadas para o espectrômetro de massa e secam pelo calor e vácuo à medida que voam para dentro. Depois que as gotas secam, as moléculas carregadas restantes são direcionadas por lentes eletromagnéticas para o detector de massa e a massa analisada. Em uma modalidade, a amostra eluída é depositada diretamente do capilar em um bocal de eletropulverização, por exemplo, o capilar funciona como o carregador de amostra. Em outra modalidade, o próprio capilar funciona como dispositivo de extração e bico de eletropulverização.

[00112] Para MALDI, as moléculas de analito (por exemplo, proteínas) são depositadas em alvos de metal e cocristalizadas com uma matriz orgânica. As amostras são secas e inseridas no espectrômetro de massa e, normalmente, analisadas por meio da detecção de tempo de voo (TOF). Em uma modalidade, a amostra eluída é depositada diretamente do capilar no alvo de metal, por exemplo, o próprio capilar funciona como o carregador de amostra. Em uma modalidade, o analito extraído é depositado em um alvo MALDI, uma matriz de ionização MALDI é adicionada e a amostra é ionizada e analisada, por exemplo, por detecção de TOF.

[00113] Em algumas modalidades, outros modos de ionização são usados, por exemplo, ESI-MS, espectrometria de massa de ionização de turbopulverização, espectrometria de massa de ionização de nanopulverização, espectrometria de massa de ionização de

termopulverização, espectrometria de massa de ionização de pulverização sônica, SELDI-MS e MALDI-MS. Em geral, uma vantagem desses métodos é que eles permitem a purificação “just-in-time” da amostra e a introdução direta no ambiente ionizante. É importante notar que os vários modos de ionização e detecção apresentam suas próprias restrições sobre a natureza da solução de dessorção usada, e é importante que a solução de dessorção seja compatível com ambos. Por exemplo, a matriz da amostra em muitas aplicações deve ter baixa força iônica, ou residir dentro de uma faixa de pH particular, etc. Em ESI, o sal na amostra pode impedir a detecção reduzindo a ionização ou obstruindo o bico. Este problema é resolvido apresentando o analito em baixo teor de sal e/ou pelo uso de um sal volátil. No caso de MALDI, o analito deve estar em um solvente compatível com a mancha no alvo e com a matriz de ionização usada.

[00114] Em algumas modalidades, os métodos incluem submeter uma partícula viral da presente divulgação, ou submeter fragmentos digeridos de uma partícula viral desnaturada da presente divulgação, a cromatografia líquida/espectrometria de massa-espectrometria de massa (LC/MS/MS). Conforme é conhecido na técnica, LC/MS/MS (o termo "cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem" pode ser usado indistintamente neste documento) utiliza cromatografia líquida para separação física de íons e espectrometria de massa para geração de dados espectrais de massa a partir dos íons, onde a espectrometria de massa usa vários estágios de separação de massa (por exemplo, m/z), normalmente separados por uma etapa de fragmentação. Por exemplo, os íons de interesse dentro de uma faixa de m/z podem ser separados em uma primeira rodada de MS, fragmentados e, em seguida, separados com base em m/z individual em uma segunda rodada de MS. A fragmentação de íons pode incluir, sem limitação, uma técnica como dissociação induzida por colisão (CID),

dissociação de colisão de alta energia (HCD), dissociação por captura de elétrons (ECD) ou dissociação por transferência de elétrons (ETD).

[00115] Uma variedade de analisadores de massa adequados para LC/MS e/ou LC/MS/MS são conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação, analisadores de tempo de voo (TOF), filtros de massa quadrupolo, TOF quadrupolo (QTOF) e armadilhas de íons (por exemplo, um espectrômetro de massa baseado em transformada de Fourier ou um Orbitrap). No Orbitrap, um eletrodo externo semelhante a um barril no potencial de terra e um eletrodo central semelhante a um fuso são usados para prender íons em trajetórias girando elipticamente em torno do eletrodo central com oscilações ao longo do eixo central, confinado pelo equilíbrio das forças centrífugas e eletrostáticas. O uso de tais instrumentos usa uma operação de transformada de Fourier para converter um sinal no domínio do tempo (por exemplo, frequência) da detecção da corrente da imagem em uma medição de massa de alta resolução (por exemplo, nano LC/MS/MS). Outras descrições e detalhes podem ser encontrados, por exemplo, em Scheltema, R.A. *et al*. (2014) Mol. Cell Proteomics 13:3698-3708; Perry, R.H. *et al*. (2008) Mass. Spectrom. Rev. 27:661-699; e Scigelova, M. *et al*. (2011) Mo/. Cell Proteomics 10:M11 1.009431.

[00116] Em algumas modalidades, as massas das proteínas do capsídeo viral podem ser determinadas, por exemplo, com base em dados de LC/MS e/ou LC/MS/MS. Em algumas modalidades, as massas de VP1, VP2 e VP3 de uma partícula de AAV, ou de fragmentos de VP1, VP2 e VP3 da partícula de AAV, podem ser determinadas, por exemplo, com base em dados de LC/MS e/ou LC/MS/MS. Vários métodos para determinar a massa e/ou identidade da proteína a partir de dados de MS são conhecidos na técnica. Por exemplo, a impressão digital da massa do peptídeo pode ser usada para determinar a sequência da proteína com base em dados de MS, ou as proteínas podem ser identificadas

com base em dados de MS/MS relacionados a um ou mais peptídeos constituintes. Ao usar MS em tandem, a varredura de íons de produto pode ser usada para analisar dados m/z relacionados a um ou mais peptídeos de uma proteína de interesse. O software conhecido na técnica pode então ser usado, por exemplo, para combinar picos identificados com picos de referência ou conhecidos, para agrupar picos em envelopes de isotopômero, e assim por diante. Os valores de massa de peptídeo podem ser comparados com uma base de dados de sequências peptídicas conhecidas. Por exemplo, o Mascot pode ser usado para combinar peptídeos observados com peptídeos de banco de dados teóricos, por exemplo, resultantes da aplicação de um padrão de digestão particular a um banco de dados de proteínas in silico. Outro software adequado pode incluir, sem limitação, Proteome Discoverer, ProteinProspector, X! Tandem, Pepfinder, Bonics ou MassLynx™ (Waters).

[00117] Em algumas modalidades, o ácido nucleico heterólogo está operacionalmente ligado a um promotor. Promotores exemplares incluem, mas não estão limitados a, o promotor precoce imediato do citomegalovírus (CMV), RSV LTR, o MoMLV LTR, o promotor da fosfoglicerato quinase-1 (PGK), um promotor do vírus símio 40 (SV40) e um promotor CK6, um promotor da transtirretina (TTR), um promotor TK, um promotor responsivo à tetraciclina (TRE), um promotor HBV, um promotor hAAT, um promotor LSP, promotores específicos do fígado quiméricos (LSPs), o promotor E2F, o promotor da telomerase (hTERT); o potencializador de citomegalovírus/promotor de beta-actina de galinha/promotor de β-globina de coelho (promotor CAG; Niwa *et al*., Gene, 1991, 108(2): 193-9) e o promotor do promotor de fator de alongamento 1- alfa (EFl-alfa) (Kim *et al*., Gene, 1990, 91(2):217-23 e Guo *et al*., Gene Ther., 1996, 3(9): 802-10). Em algumas modalidades, o promotor compreende um promotor de β-glucuronidase humana ou

um potencializador de citomegalovírus ligado a um promotor de β-actina de galinha (CBA). O promotor pode ser um promotor constitutivo, indutível ou repressível. Em algumas modalidades, a invenção fornece um vetor recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica um transgene heterólogo da presente divulgação operacionalmente ligado a um promotor CBA.

[00118] Exemplos de promotores constitutivos incluem, sem limitação, o promotor LTR do vírus do sarcoma de Rous retroviral (RSV) (opcionalmente com o potencializador de RSV), o promotor do citomegalovírus (CMV) (opcionalmente com o potencializador de CMV), o promotor SV40, o promotor da di-hidrofolato redutase, o promotor 13-actina, o promotor fosfoglicerol quinase (PGK) e o promotor EFla.

[00119] Os promotores induzíveis permitem a regulação da expressão gênica e podem ser regulados por compostos fornecidos exogenamente, fatores ambientais como temperatura ou a presença de um estado fisiológico específico, por exemplo, fase aguda, um estado de diferenciação específico da célula ou apenas na replicação de células. Os promotores induzíveis e os sistemas induzíveis estão disponíveis a partir de uma variedade de fontes comerciais, incluindo, sem limitação, Invitrogen, Clontech e Ariad. Muitos outros sistemas foram descritos e podem ser facilmente selecionados por uma pessoa versada na técnica. Exemplos de promotores induzíveis regulados por compostos fornecidos exogenamente incluem o promotor de metalotionina (MT) de ovelha induzível por zinco, o promotor do vírus do tumor mamário de camundongo induzível por dexametasona (Dex) (MMTV), o sistema promotor da polimerase T7 (WO 98/10088); o promotor de insetos ecdisona (No *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 93:3346-3351(1996)), o sistema repressível à tetraciclina (Gossen *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 89:5547-5551 (1992)), o sistema induzível à tetraciclina (Gossen *et al*. Science, 268:1766-1769 (1995), ver também

Harvey *et al*. Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), o sistema induzível por RU486 (Wang *et al*. Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) e Wang *et al*. Gene Ther., 4:432-441 (1997)) e o sistema induzível por rapamicina (Magari *et al*. J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Outros tipos adicionais de promotores induzíveis que podem ser úteis neste contexto são aqueles que são regulados por um estado fisiológico específico, por exemplo, temperatura, fase aguda, um estado de diferenciação específico da célula ou apenas na replicação de células.

[00120] Em outra modalidade, o promotor nativo, ou fragmento deste, será usado para o transgene. O promotor nativo pode ser usado quando se deseja que a expressão do transgene imite a expressão nativa. O promotor nativo pode ser usado quando a expressão do transgene deve ser regulada temporariamente ou em desenvolvimento, ou de forma específica de tecido, ou em resposta a estímulos transcricionais específicos. Em uma outra modalidade, outros elementos de controle de expressão nativos, tais como elementos potencializadores, sítios de poliadenilação ou sequências de consenso de Kozak, podem também ser usados para imitar a expressão nativa.

[00121] Em algumas modalidades, as sequências reguladoras conferem capacidades de expressão de genes específicos de tecido. Em alguns casos, as sequências reguladoras específicas do tecido se ligam aos fatores de transcrição específicos de tecido que induzem a transcrição de maneira específica de tecido. Tais sequências reguladoras específicas de tecido (por exemplo, promotores, potencializadores, etc.) são bem conhecidas na técnica.

[00122] Em algumas modalidades, o vetor compreende um íntron. Por exemplo, em algumas modalidades, o íntron é um íntron quimérico derivado de beta-actina de galinha e beta-globina de coelho. Em algumas modalidades, o íntron é um íntron de vírus minuto de camundongos (MVM).

[00123] Em algumas modalidades, o vetor compreende uma sequência de poliadenilação (poliA). Numerosos exemplos de sequências de poliadenilação são conhecidas na técnica, tais como uma sequência Poly (A) de hormônio de crescimento bovino (BGH) (ver, por exemplo, número de acesso EF592533), uma sequência de poliadenilação SV40 e uma sequência de poliadenilação HSV TK pA.

[00124] Os exemplos de sistemas, métodos e atos descritos nas modalidades apresentadas anteriormente são ilustrativos e, em modalidades alternativas, certos atos podem ser realizados em uma ordem diferente, em paralelo um com o outro, totalmente omitidos e/ou combinados entre diferentes modalidades de exemplo, e/ou certos atos adicionais podem ser realizados, sem se afastar do escopo e do espírito de várias modalidades. Consequentemente, tais modalidades alternativas estão incluídas nos exemplos descritos neste documento.

[00125] Embora modalidades específicas tenham sido descritas acima em detalhes, a descrição é meramente para fins de ilustração. Deve ser apreciado, portanto, que muitos aspectos descritos acima não são pretendidos como elementos necessários ou essenciais, a menos que explicitamente declarado de outra forma. Modificações e componentes equivalentes ou atos correspondentes aos aspectos divulgados das modalidades de exemplo, além daqueles descritos acima, podem ser feitas por uma pessoa versada na técnica, tendo o benefício da presente divulgação, sem se afastar do espírito e escopo das modalidades definidas nas reivindicações a seguir, cujo escopo deve receber a interpretação mais ampla, de modo a abranger tais modificações e estruturas equivalentes.

[00126] Os exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar características particulares de certas modalidades. No entanto, as características particulares descritas abaixo não devem ser consideradas como limitações ao escopo da invenção, mas sim como

exemplos a partir dos quais equivalentes serão reconhecidos por aqueles versados na técnica.

EXEMPLO

[00127] O seguinte exemplo é apresentado de modo a fornecer aos versados na técnica uma divulgação e descrição completas de como preparar e utilizar os métodos da invenção e não se destinam a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão com respeito a números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, *etc*), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser considerados. A menos que indicado de outra forma, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura é em graus Centígrados, a temperatura ambiente é de cerca de 25ºC, e a pressão é atmosférica ou próxima.

Separação de Proteínas de Capsídeo de Partículas de AAV Intactas

[00128] Para a separação de partículas virais de AAV9 intactas, 1 µL da amostra de AAV foi injetado em uma coluna HILIC, conforme descrito na tabela abaixo. Os resultados da separação são mostrados na Figura 4. Conforme mostrado, as três proteínas de capsídeo de AAV mostraram resolução completa entre si.

[00129] A Tabela 1 mostra um sumário das condições cromatográficas usadas para a separação de proteínas de capsídeo de AAV9 de um capsídeo de AAV9 intacto.

Tabela 1: Sumário das condições cromatográfica

Sistema UPLC	Waters ACQUITY UPLC I-Class
Fase Móvel	A: TFA a 0,1% em água
	B: TFA a 0,1%em acetonitrilo
Coluna	ACQUITY UPLC® Glycoprotein BEH Amide 1,7 µm, 2,1 mm X 150 mm, Part. Nº 186007963
Temperatura de Coluna	60 °C ±1 °C
Temperatura de	5 °C ±2 °C

Sistema UPLC	Waters ACQUITY UPLC I-Class			
Autoamostrador				
Gradiente	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	%A	%B
	0	0,2	15,0	85,0
	0,5	0,2	15,0	85,0
	1,0	0,2	25,0	75,0
	41,0	0,2	40,0	60,0
	42,0	0,2	100,0	0,0
	44,0	0,2	100,0	0,0
	45,0	0,2	15,0	85,0
	55,0	0,2	15,0	85,0
Comprimento de Onda de Detector	280 mm			

[00130] Em comparação com a separação baseada em RP, o mecanismo de retenção exclusivo da coluna HILIC funcionou surpreendentemente melhor para a separação VP (ver Figuras 4, 3A e 3B).

Análise Espectral de Massa de Proteínas de Capsídeo de AAV Separadas

[00131] Uma das vantagens dos métodos descritos neste documento é que nenhuma preparação de amostra é necessária. 1uL da amostra foi injetado diretamente no LC-MS e os dados resultantes analisados. Os seguintes parâmetros de ajuste foram aplicados em um espectrômetro de massa Q-Exactive Plus para análise de massa intacta:

Tensão de pulverização	3,5 kV
Temperatura Capilar	350 °C
Nível de RF da lente S	60
Taxa de fluxo do gás do invólucro	40
Taxa de fluxo de gás auxiliar	15
CID na fonte	0,0 eV
intervalo m/z	800-4000

[00132] As Figuras 5A-5D mostram os espectros de massa das proteínas do capsídeo individuais. Conforme mostrado na Figura 5A, havia heterogeneidade de proteínas em VP3.

[00133] Conforme mostrado na Figura 6, a altura do pico pode ser usada para determinar a estequiometria das partículas de AAV intactas.

[00134] A presente invenção não deve ser limitada em escopo pelas modalidades específicas descritas neste documento. De fato, várias modificações da invenção além daquelas mostradas e descritas neste documento se tornarão evidentes para os versados na técnica a partir da descrição anterior e das figuras anexas. Tais modificações se destinam a cair dentro do escopo das reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar a estequiometria de componentes proteicos de um capsídeo viral de uma partícula viral, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

submeter uma amostra de partículas virais a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) para separar os componentes da proteína do capsídeo viral das partículas virais;

determinar as massas dos componentes da proteína do capsídeo viral para identificar os componentes da proteína separados por HILIC;

determinar a abundância relativa dos componentes da proteína do capsídeo viral a partir da separação de HILIC, determinando assim a estequiometria dos componentes da proteína de um capsídeo viral de uma partícula viral.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a partícula viral compreende uma partícula de vírus adeno-associado (AAV).

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que os componentes do capsídeo proteico compreendem VP1, VP2 e VP3 da partícula de AAV.

4. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que as massas de VP1, VP2 e VP3 são comparadas às massas teóricas de um ou mais de um capsídeo de AAV1, um capsídeo de AAV2, um capsídeo de AAV3, um capsídeo de AAV4, um capsídeo de AAV5, um capsídeo de AAV6, um capsídeo de AAV7, um capsídeo de AAV8, um capsídeo de AAVrh8, um capsídeo de AAV9, um capsídeo de AAV10, um capsídeo de AAV11, um capsídeo de AAV 12 ou uma variante destes.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV compreende um

capsídeo de AAV1, um capsídeo de AAV2, um capsídeo de AAV3, um capsídeo de AAV4, um capsídeo de AAV5, um capsídeo de AAV6, um capsídeo de AAV7, um capsídeo de AAV8, um capsídeo de AAVrh8, um capsídeo de AAV9, um capsídeo de AAV10, um capsídeo de AAV11, um capsídeo de AAV 12 ou uma variante destes.

6. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV compreende uma AAV1 ITR, uma AAV2 ITR, uma AAV3 ITR, uma AAV4 ITR, uma AAV5 ITR, uma AAV6 ITR, uma AAV7 ITR, uma AAV8 ITR, uma AAV9 ITR, uma AAV 10 ITR, uma AAV11 ITR ou uma AAV12 ITR.

7. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV é uma partícula de AAV recombinante (rAAV) ou um vetor de AAV que codifica um transgene heterólogo.

8. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo selecionado para transdução de células do fígado de um indivíduo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV tem um sorotipo de capsídeo de AAV7, AAV8 ou AAV9.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV tem um sorotipo de capsídeo de AAV9.

11. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a partícula de AAV tem um serotipo de capsídeo de AAV9 e é um vetor viral que codifica a Alfa Glucosidase Lisossomal (GAA) ligada a um anticorpo anti-CD63.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a partícula viral compreende um vetor

viral que codifica um transgene heterólogo ou pertence a uma família viral selecionada do grupo que consiste em Adenoviridae, Parvoviridae, Retroviridae, Baculoviridae e Herpesviridae.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a partícula viral pertence a um gênero viral selecionado a partir do grupo que consiste em Atadenovirus, Aviadenovirus, Ichtadenovirus, Mastadenovirus, Siadenovirus, Ambidensovirus, Brevidensovirus, Hepandensovirus, Iteradensovirus, Penstyldensovirus, Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Eritroparvovirus, Protoparvovirus, Tetraparvovirus, Alfaretrovirus, Betaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Gammaretrovirus, Lentivirus, Spumavirus, Alfabaculovirus, Betabaculovirus, Deltabaculovirus, Gammabaculovirus, Iltovirus, Mardivirus, Simplexvirus, Varicellovirus, Citomegalovirus, Muromegalovirus, Proboscivirus, Roseolovirus, Linfocriptovirus, Macavirus, Percavirus, e Rhadinovirus.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o Retroviridae é o vírus do sarcoma murino Moloney (MoMSV), vírus do sarcoma murino Harvey (HaMuSV), vírus do tumor mamário murino (MuMTV), vírus da leucemia do macaco gibão (GaLV), vírus da leucemia felina (FLV), spumavírus, vírus Friend, vírus da célula-tronco murina (MSCV), vírus Rous Sarcoma (RSV), vírus da leucemia de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da imunodeficiência equina (EIV), vírus visna-maedi; vírus da artrite-encefalite caprina; vírus da anemia infecciosa equina; vírus da imunodeficiência felina (FIV); vírus da imunodeficiência bovina (BIV); ou vírus da imunodeficiência símia (SIV).

15. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o HILIC usa uma fase móvel A

compreendendo ácido trifluoroacético em água ou uma fase móvel B compreendendo ácido trifluoroacético em acetonitrila.

16. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que a fase móvel A ou a fase móvel B compreende cerca de 0,1% de ácido trifluoroacético.

17. Método, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de que a proporção de fase móvel A na cromatografia aumenta ao longo do tempo.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a fase móvel A aumenta de cerca de 15% a cerca de 100%, ao longo de cerca de 45 minutos.

19. Método para determinar a heterogeneidade dos componentes da proteína em um capsídeo de uma partícula viral, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

submeter a partícula viral a cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) para separar os componentes da proteína do capsídeo da partícula viral;

determinar as massas dos componentes da proteína do capsídeo proteico;

comparar as massas determinadas dos componentes da proteína do capsídeo da partícula viral com massas teóricas, em que um desvio de uma ou mais das massas dos componentes da proteína do capsídeo da partícula viral das massas teóricas é indicativo de heterogeneidade do capsídeo.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que a heterogeneidade compreende um ou mais dos sorotipos mistos, capsídeos variantes, substituições de aminoácidos do capsídeo, capsídeos truncadas ou capsídeos modificados.

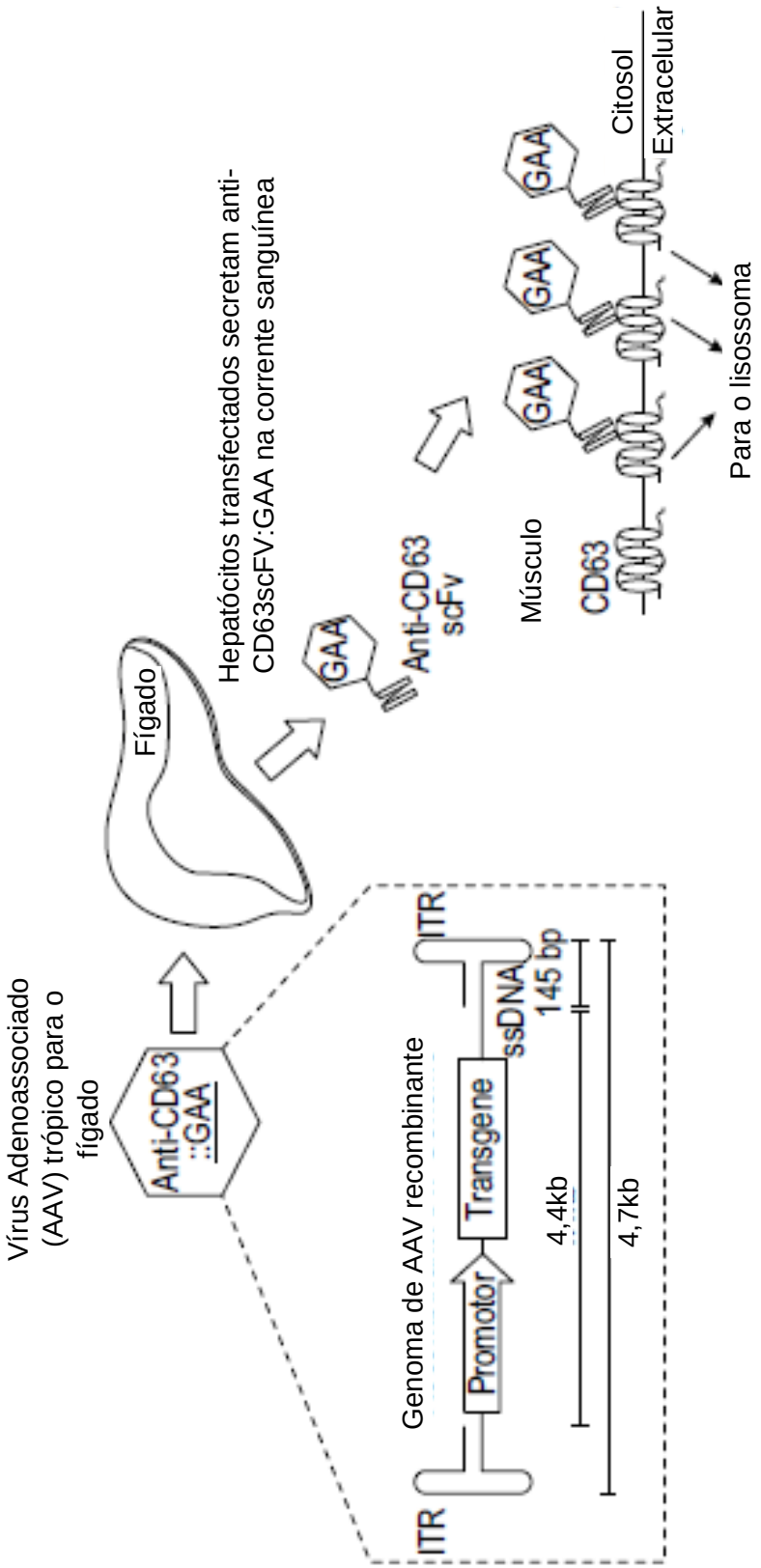

Vírus Adenoassociado (AAV) trópico para o fígado
Anti-CD63 ::GAA
Fígado
Hepatócitos transfectados secretam anti-CD63scFV:GAA na corrente sanguínea
GAA
Anti-CD63 scFv
Genoma de AAV recombinante
ITR
Promotor
Transgene
ssDNA
ITR
145 bp
4,4kb
4,7kb
Músculo
CD63
GAA
GAA
GAA
GAA
Citosol
Extracelular
Para o lisossoma

FIGURA 1

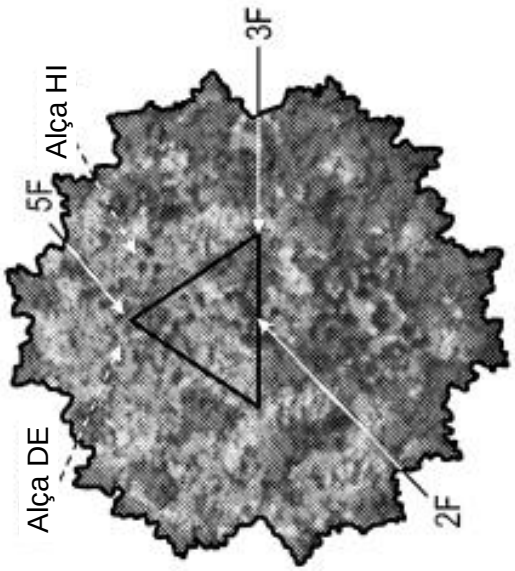


FIGURA 2A

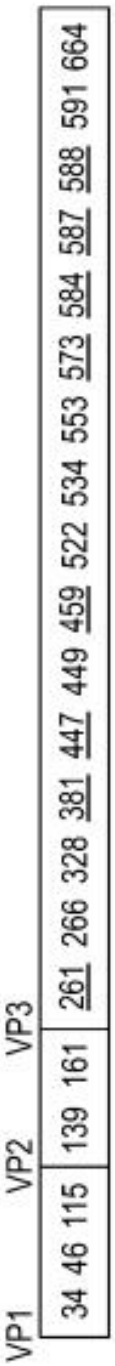


FIGURA 2B

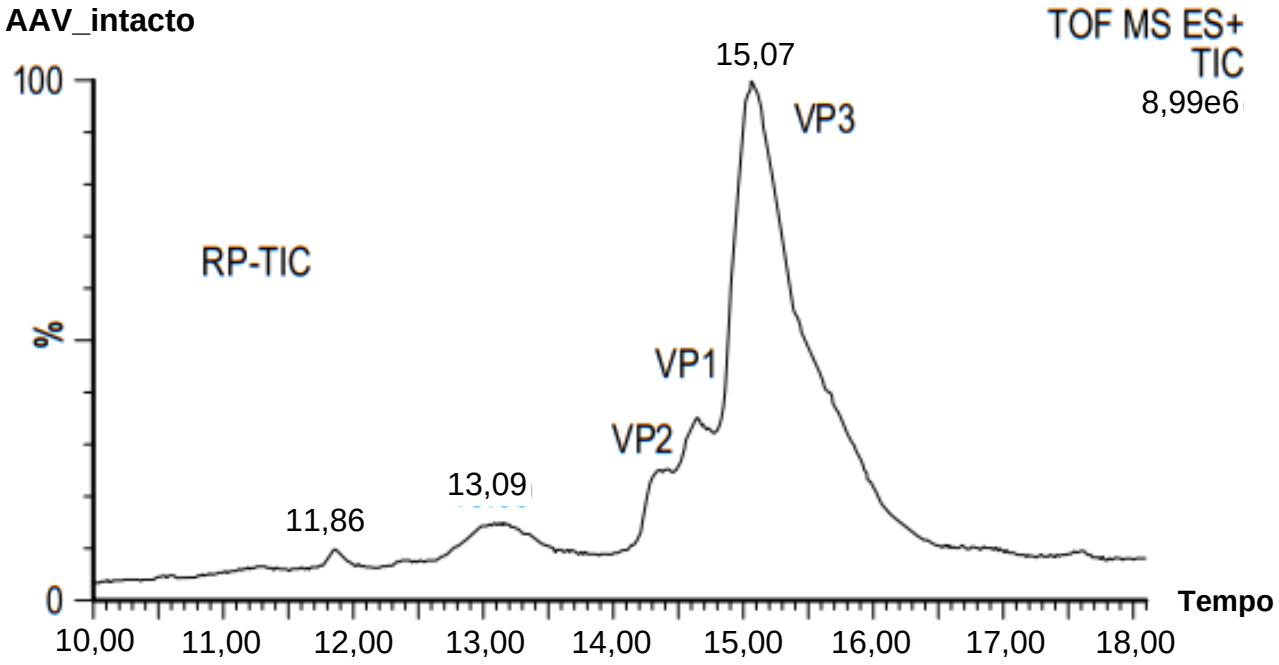

AAV_intacto
TOF MS ES+
TIC
8,99e6
100
%
0
RP-TIC
11,86
13,09
VP2
VP1
15,07
VP3
Tempo
10,00
11,00
12,00
13,00
14,00
15,00
16,00
17,00
18,00

FIGURA 3A

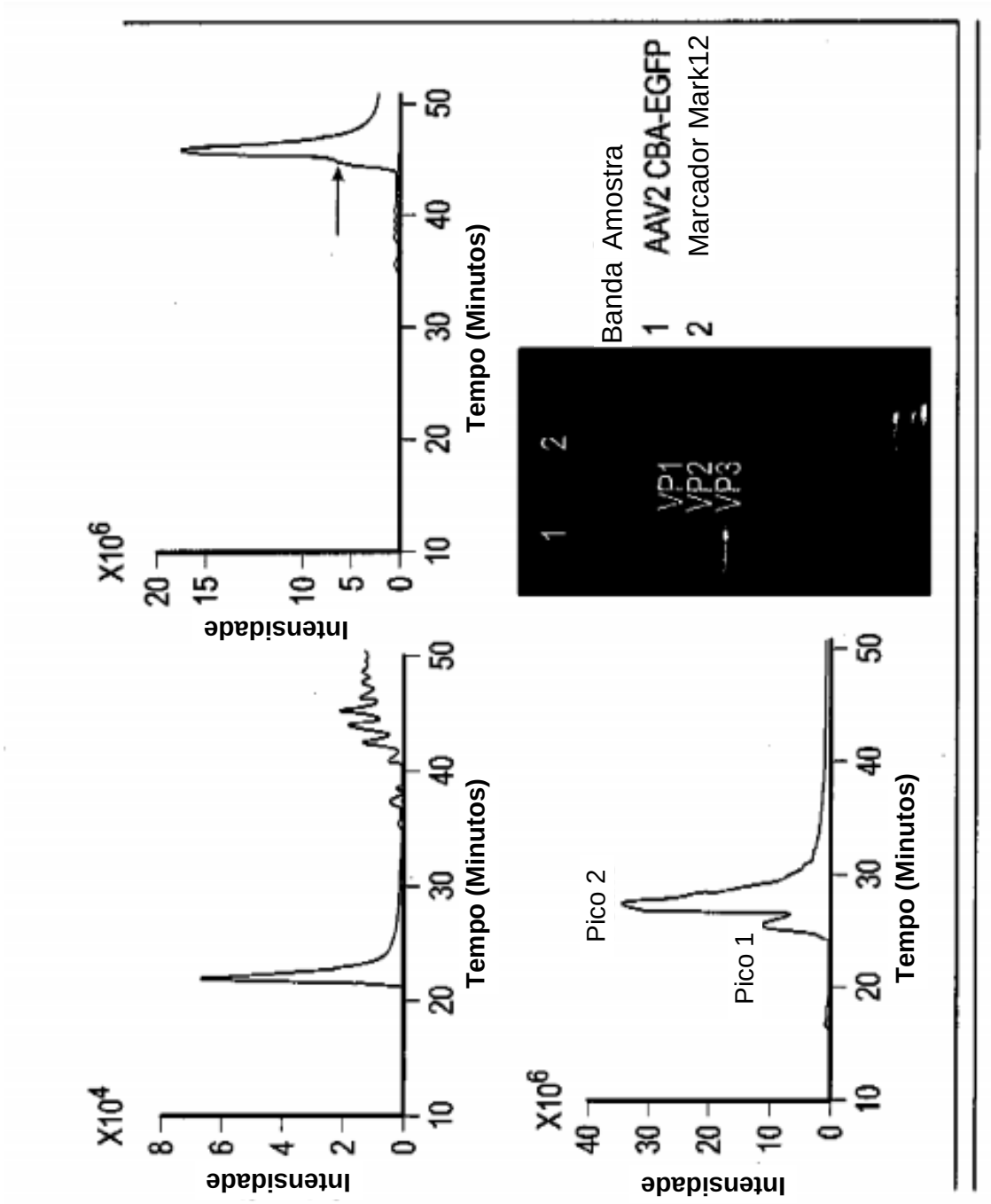

X10^6
Intensidade
Tempo (Minutos)
X10^4
Intensidade
Tempo (Minutos)
Banda Amostra
1 AAV2 CBA-EGFP
2 Marcador Mark12
1
2
VP1
VP2
VP3
X10^6
Intensidade
Pico 2
Pico 1
Tempo (Minutos)

FIGURA 3B

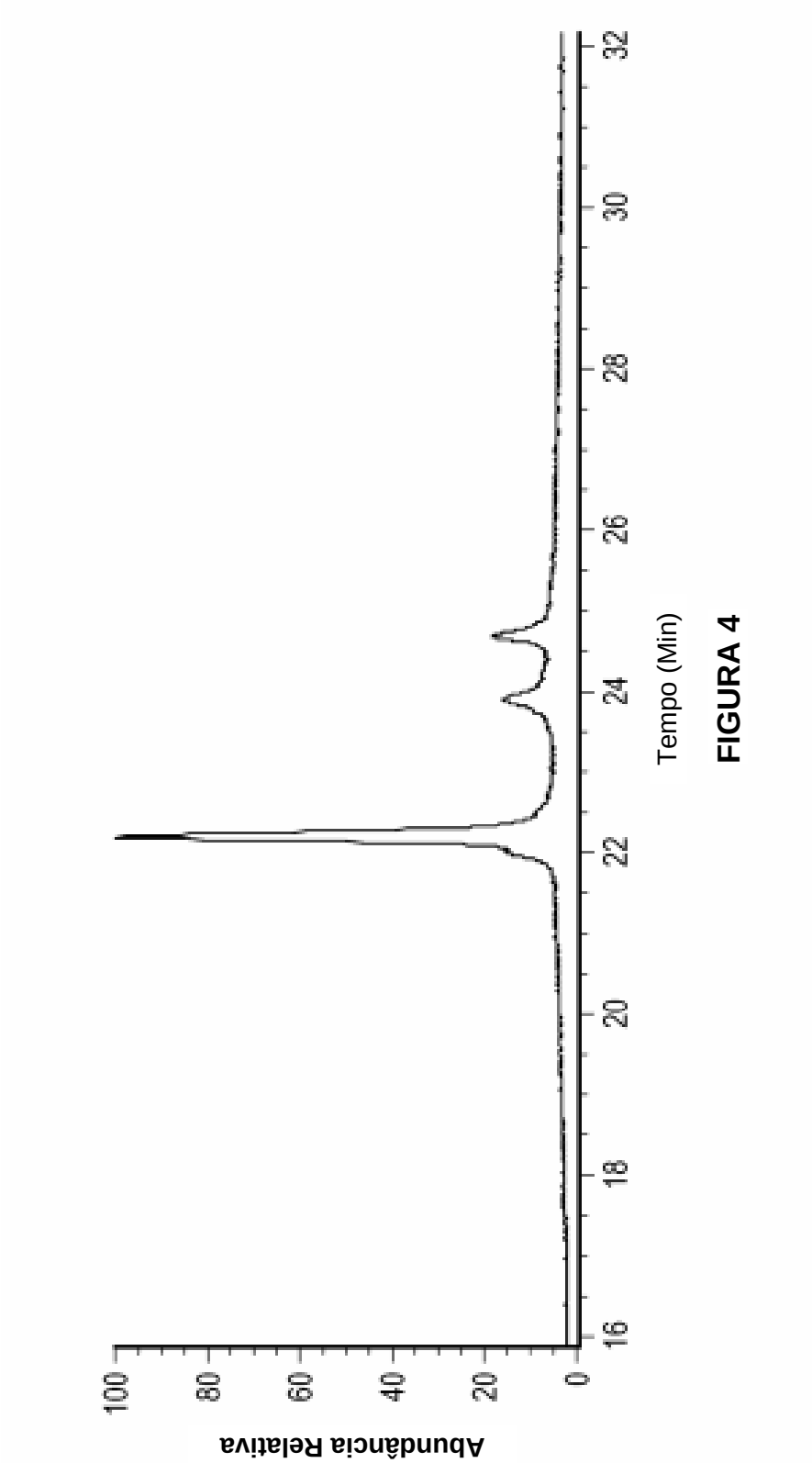

Abundância Relativa
100
80
60
40
20
0
16
18
20
22
24
26
28
30
32
Tempo (Min)

FIGURA 4

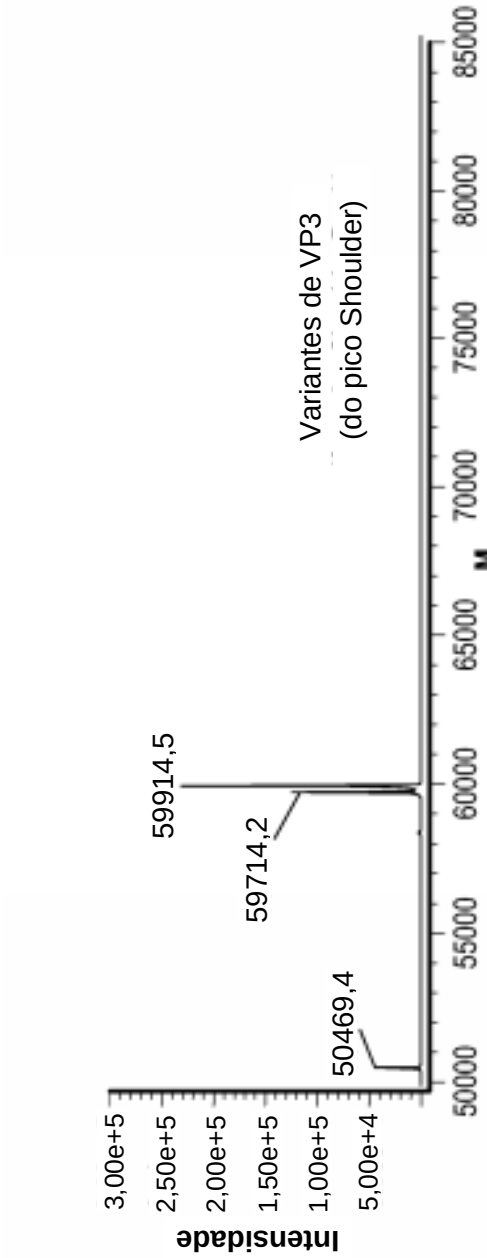


FIGURA 5A

FIGURA 5B

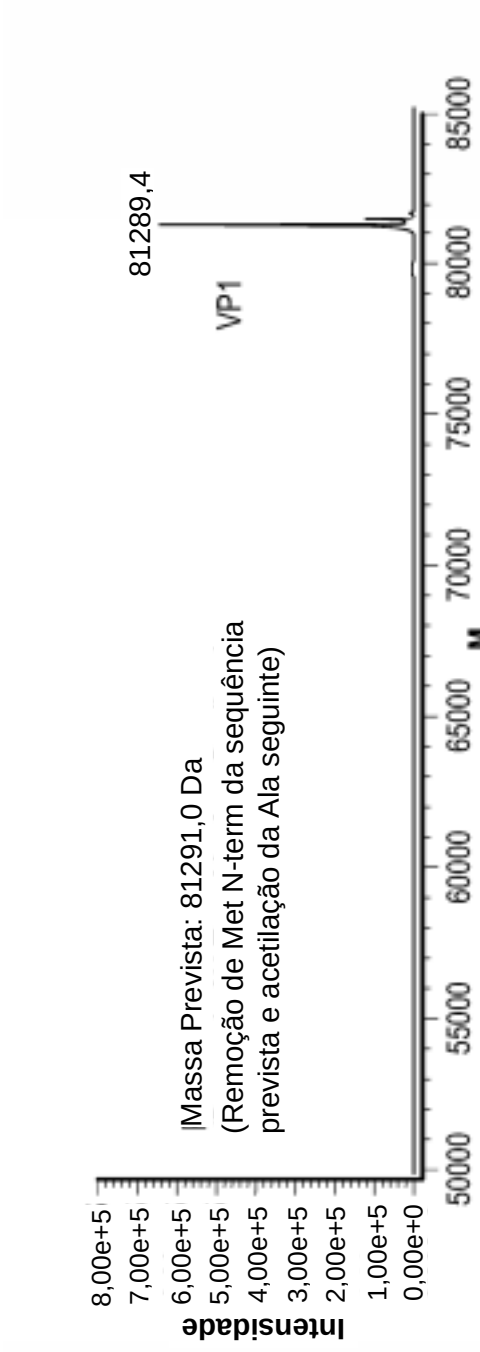


FIGURA 5C

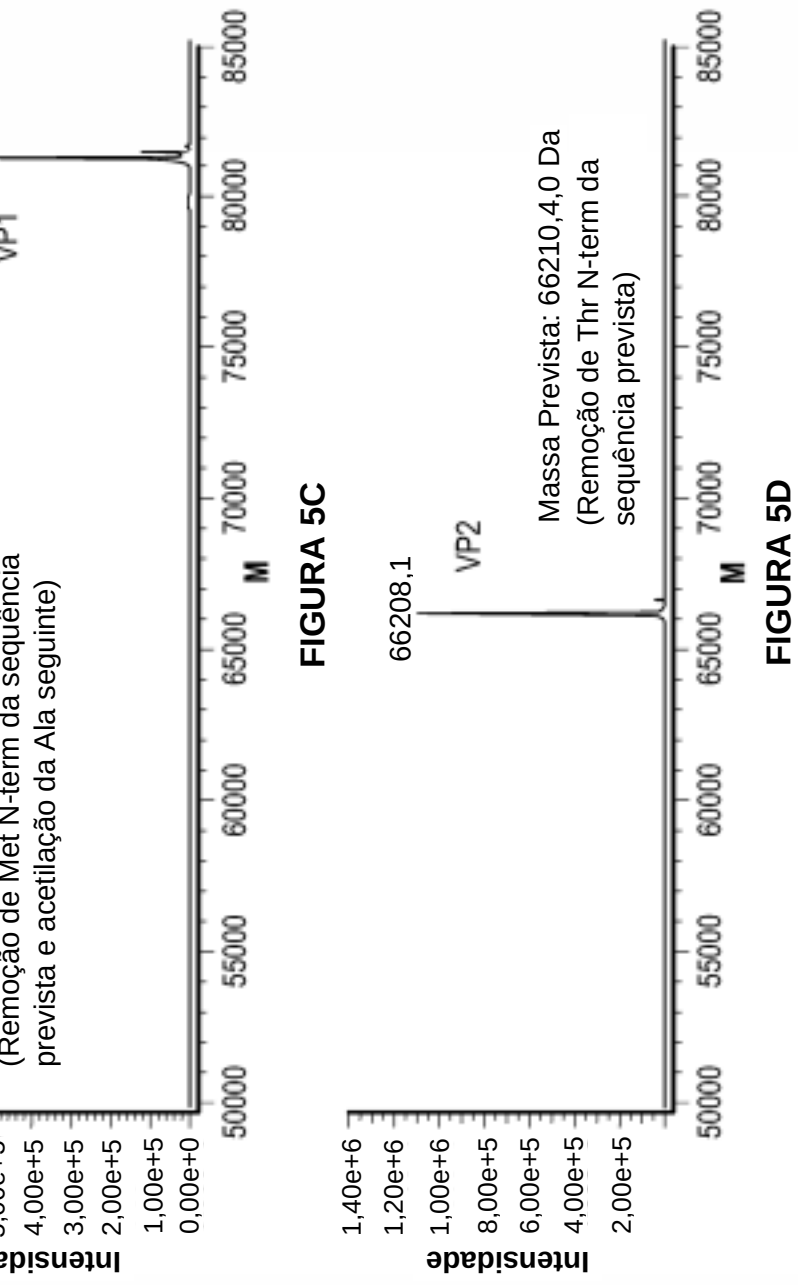


FIGURA 5D

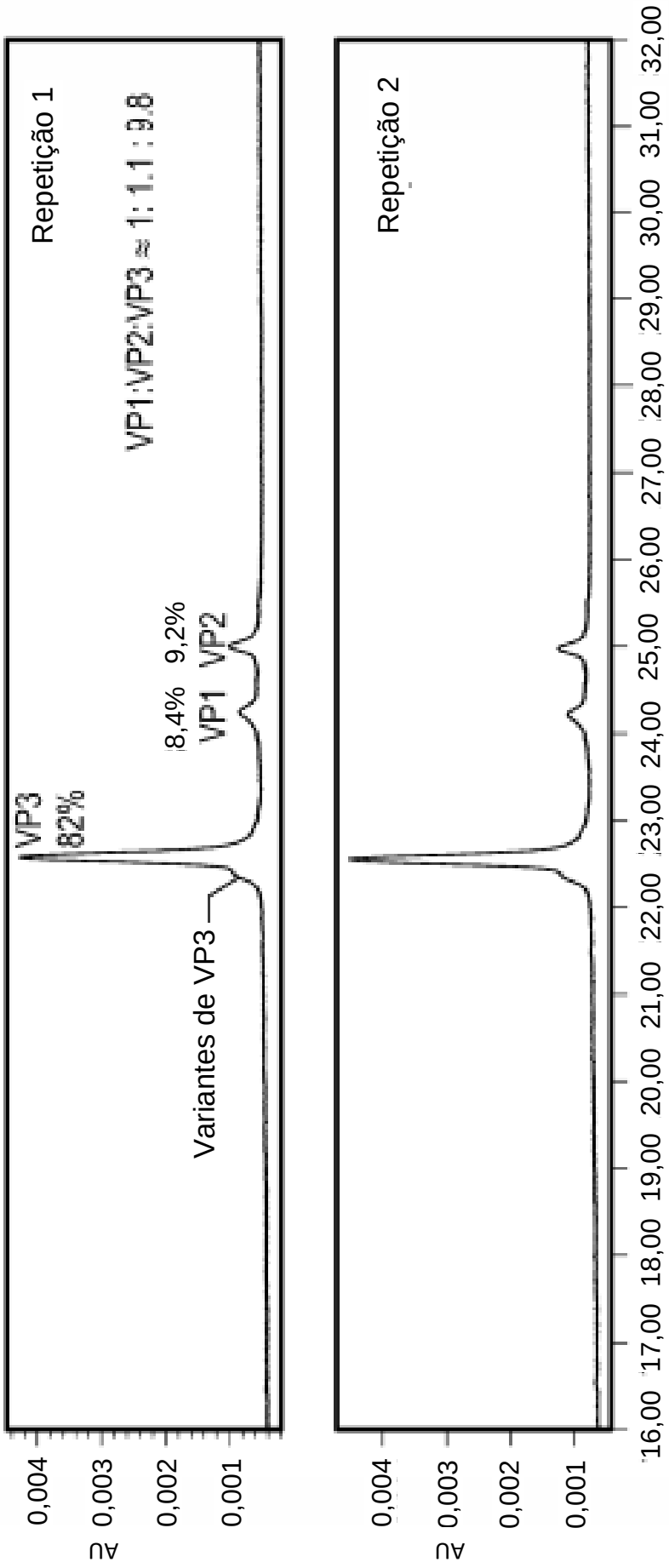

Repetição 1
VP1:VP2:VP3 ≈ 1: 1.1 : 9.8
VP3
82%
8,4%
VP1
9,2%
VP2
Variantes de VP3
Repetição 2
AU
0,004
0,003
0,002
0,001
16,00
17,00
18,00
19,00
20,00
21,00
22,00
23,00
24,00
25,00
26,00
27,00
28,00
29,00
30,00
31,00
32,00
Minutos

FIGURA 6

RESUMO

Patente de Invenção: **“MÉTODOS PARA ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE PROTEÍNA DE CAPSÍDEO VIRAL”.**

A presente invenção refere-se a métodos para determinar a estequiometria de um capsídeo viral e/ou determinar a heterogeneidade dos componentes da proteína em um capsídeo viral.