



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0800957-0 A2**



(22) Data de Depósito: 04/04/2008  
(43) Data da Publicação: 17/11/2009  
(RPI 2028)

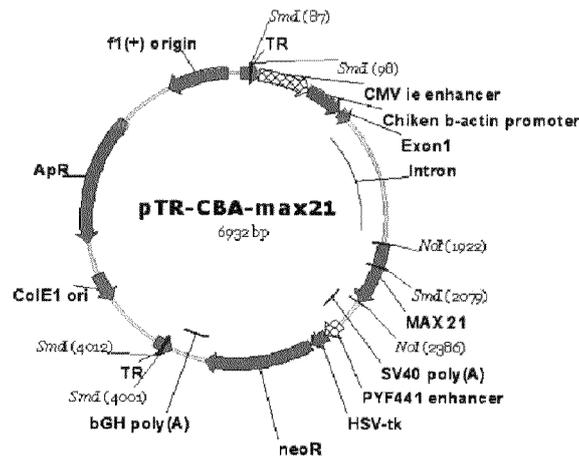
(51) *Int.Cl.:*  
C12N 15/79 (2009.01)  
C12N 15/86 (2009.01)  
C12N 15/12 (2009.01)  
A61K 48/00 (2009.01)  
A61P 25/00 (2009.01)

(54) Título: **VETORES BIOLÓGICOS  
COMPREENDENDO O GENE MAX, MÉTODO DE  
PRODUÇÃO DOS MESMOS, MÉTODO DE  
EXPRESSION DO GENE MAX NAS CÉLULAS E  
MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA CITOPROTETORA**

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

(72) Inventor(es): HILDA PETRS SILVA, RAFAEL LINDEN

(57) Resumo: VETORES BIOLÓGICOS COMPREENDENDO O GENE MAX, MÉTODO DE PRODUÇÃO DOS MESMOS, MÉTODO DE EXPRESSÃO DO GENE MAX NAS CÉLULAS E MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA CITOPROTETORA. A presente invenção está relacionada a construções de vetores de clonagem contendo o gene max. Especialmente, a presente invenção trata da introdução dos vetores de clonagem contendo o gene max nas células utilizando vetores de transporte. Adicionalmente, a presença de vetores de clonagem contendo o gene max nas células permite a expressão diferencial do gene max nas mesmas células. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um método de terapia gênica no qual a expressão diferencial do gene max possui atividade citoprotetora, especialmente neuroprotetora, podendo ser aplicada a terapêutica médica e veterinária para condições de neurodegeneração.





### Relatório Descritivo

VETORES BIOLÓGICOS COMPREENDENDO O GENE MAX, MÉTODO DE PRODUÇÃO DOS MESMOS, MÉTODO DE EXPRESSÃO DO GENE MAX NAS CÉLULAS E MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA CITOPROTETORA.

5

#### Campo da Invenção

A presente invenção está relacionada a construções de vetores de clonagem contendo o gene *max*. Especialmente, a presente invenção trata da introdução dos vetores de clonagem contendo o gene *max* nas células utilizando vetores de transporte. Adicionalmente, a presença de vetores de clonagem contendo o gene *max* nas células permite a expressão diferencial do gene *max* nas mesmas células. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um método de terapia gênica no qual a expressão diferencial do gene *max* possui atividade citoprotetora, especialmente neuroprotetora, podendo ser aplicada a terapêutica médica e veterinária para condições de neurodegeneração.

#### Antecedentes da Invenção

##### **Terapia Gênica**

O desenvolvimento explosivo das metodologias de DNA recombinante e o sequenciamento do genoma humano abriram novas perspectivas de manejo de doenças hereditárias ou adquiridas de natureza genética, bem como de outras patologias, incluindo doenças degenerativas e infecciosas, através das tecnologias de terapia gênica (ou *terapia genética*).

A identificação de bases genéticas da patogênese de certas doenças, algumas das quais devidas à mutação de um único gene, assim como de fatores predisponentes associados ou envolvidos na patogênese ou nos mecanismos de defesa contra doenças, revelam oportunidades de intervenção direta na expressão de genes com fins terapêuticos.

Entende-se por terapia genética o conjunto de técnicas destinadas a inserir e expressar material genético exógeno em células com finalidade terapêutica. A transferência de material genético pode ser feita *in vivo* (diretamente no organismo-alvo) ou *ex vivo*, através da transdução de células a serem inseridas no organismo-alvo. Ou seja, a terapia gênica pode ser combinada com terapias celulares, incluindo células-tronco.

Concebida nos anos sessenta, a terapia genética atingiu seu primeiro ensaio clínico no final da década de 80. O *Journal of Gene Medicine* registra, em julho de 2007, um total de 1300 ensaios clínicos em andamento. Destes, em toda América Latina, apenas um é sediado no México e nenhum na América do Sul. A pesquisa em terapia genética no Brasil tem sido impulsionada através do Instituto do Milênio – Rede de Terapia Gênica, apoiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e CNPq.

### **Vetores Biológicos**

As células são, normalmente, resistentes à entrada de DNA exógeno. Para superar este obstáculo, utiliza-se um veículo empregado para inserção do gene (denominado “vetor de transporte”), a fim de aumentar a probabilidade de penetração do DNA. Os mais utilizados no estado da arte são construções obtidas a partir de vírus, devido ao fato desses microorganismos possuírem naturalmente a capacidade de infectar células vivas. Entretanto, também é possível realizar a utilizar vetores “não-virais” como o DNA plasmidial para a introdução de DNA em células exógenas. Para a introdução dos vetores de clonagem nas células existem alguns métodos físicos e bioquímicos. Entre os vetores não-virais podemos citar a microinjeção, eletroporação, injeção de plasmídeo, injeção balística de DNA, plasmídeos, lipossomos, compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica como DNA-fosfato de cálcio, DNA-DEAE dextran, DNA-lípide, DNA-proteína, DNA-lípide-proteína e HACs (cromossomos artificiais) utilizados em terapia gênica. Entre os vetores de transporte virais podemos citar retrovírus, adenovírus, adeno-associados, híbridos adenovírus-AAV, herpes simples, lentivirus, HIV e vaccinia.

Para utilização em terapia genética dos vetores virais, os vírus são modificados por técnicas de DNA recombinante, para remoção de genes associados à patogênese viral com o objetivo de obter uma construção mínima capaz de infectar células sem produzir replicação viral e sem causar efeitos patogênicos. Nesta construção também pode ser introduzido adicionalmente um gene de interesse e a construção resultante é utilizada para inserir o gene de interesse em células do organismo a ser tratado.

Entretanto, a inserção e expressão de genes em um organismo é um processo invasivo. Tanto o gene introduzido quanto o vetor viral podem produzir reações adversas relacionadas ao desequilíbrio na expressão gênica ou à presença de antígenos estranhos ao organismo. Esse último reage à presença de vírus, ativando respostas inflamatórias e imunitárias que podem ser danosas ao receptor da terapia genética. Uma das áreas mais competitivas de biotecnologia aplicada a terapias genéticas é a busca de vetores mais seguros e, ao mesmo tempo, capazes de infectar produtivamente as células alvo da terapia e manter a expressão do gene de interesse por longos períodos.

Em especial, construções derivadas de vírus adeno-associados (AAV) tem despertado grande interesse como um vetor potencial para transferência de genes em tentativas de terapia gênica humana. Entre as suas propriedades mais favoráveis estão: (I) nenhuma relação do vírus adeno-associado com doenças humanas; (II) poder de infecção de linhagens celulares derivadas de diferentes tecidos; (III) persistência dos vetores derivados de AAV em forma epissomal, evitando mutagênese insercional; (IV) capacidade de infectar células que não estejam em processo de divisão.

A capacidade de transdução com AAV recombinante (rAAV) tem sido demonstrada em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo as diferenciadas, o que sugere um grande potencial desse sistema de vetor para transferência gênica *in vivo* para órgãos como músculo, fígado, sistema nervoso central e pulmão. Vetores rAAV são derivados de plasmídeos que carregam os terminais invertidos repetidos (ITRs) flanqueando o gene exógeno

de interesse. Os terminais invertidos repetidos são seqüências de 145 bases cada, simétricos, que são necessários para a replicação do DNA do AAV. Tradicionalmente a produção dos vetores rAAV era feita pela co-transfecção de células HEK293 por 2 plasmídeos, um contendo o gene de interesse 5 flanqueado por ITRs e um segundo plasmídeo contendo os genes de empacotamento *rep* e *cap*, além de um vírus auxiliar (adenovírus ou vírus da herpes), cuja função é fornecer os fatores auxiliares essenciais para replicação do AAV. Técnicas modernas empregam somente co-transfecção de um 10 plasmídeo principal de AAV contendo o gene de interesse e sua seqüência de regulação, flanqueado por ITRs e um plasmídeo auxiliar contendo todas as seqüências mínimas requeridas para empacotamento. Este procedimento, além de aumentar o rendimento do processo de produção, destina-se a evitar a contaminação das preparações de rAAV por adenovírus, que são patogênicos e, por esta razão, foram substituídos pelo plasmídeo auxiliar mínimo. O rAAV é 15 recuperado após a lise celular e o plasmídeo auxiliar é removido junto com o DNA das células produtoras. Desta forma, atualmente três elementos são requeridos para o empacotamento do vetor AAV: (I) células eucarióticas em cultura, (II) o plasmídeo principal com o gene de interesse e a seqüência de replicação (ITR) e (III) o plasmídeo auxiliar com os genes virais para replicação.

20 Os vetores rAAV são, em geral, não-patogênicos e, dentre os vetores virais existentes, são os mais seguros. Assim, plataformas de expressão baseadas em rAAV têm grande potencial de aplicação clínica.

No âmbito patentário, muitos documentos descrevem as construções de vetores de transporte para terapias genéticas. Podemos exemplificar o uso 25 desses vetores para terapias gênicas pelos documentos a seguir.

O documento US 6,521,225 descreve a construção de novos vetores virais adeno-associados (AAV), especificamente para a entrega de moléculas terapêuticas no fígado. Esse vetor contém duas seqüências invertidas terminais (ITRs), cada uma delas compreendendo uma seqüência de 5 a 15 nucleotídeos 30 específica, podendo ter uma ou mais deleções ou substituições.

Um outro documento, o US 6,482,634, descreve métodos de construção de vetores úteis na produção de AAVs recombinantes (rAAVs). O método descrito inclui uma célula hospedeira contendo uma molécula de ácido nucléico 5'-3', um promotor P5 de parvovírus, um espaçador, uma seqüência *rep* AAV e uma seqüência AAV do gene *cap*. O espaçador reduzirá a expressão dos produtos gênicos *rep78* e *rep68*. A segunda molécula de ácido nucléico contém um minigene e este, por sua vez, contém um transgene flanqueado por ITRs, que está sob o controle de seqüências regulatórias direcionadas a expressão na célula hospedeira e às funções essenciais para a replicação e empacotamento do rAAV.

O documento WO0182973 descreve vetores virais e não-virais como veículos para entrega de transgenes para o tratamento de patologias ósseas através da administração local de um veículo de entrega compreendendo o transgene para pacientes sem matriz compatível óssea. Esse documento descreve um veículo de entrega (vetor) viral ou não-viral compreendendo informação genética relacionada a fatores osteoindutores terapêuticos para células alvo *in vivo*, fazendo com que as células passem a produzir fatores osteoindutivos no local da patologia óssea.

Esses documentos não se sobrepõem à presente invenção, pois os vetores biológicos em questão não compreendem o vetor de clonagem contendo o gene *max* e não citam o uso do mesmo em terapias neuroprotetoras.

### **Doenças Neurodegenerativas**

Existem muitas revisões recentes na literatura sobre aplicação de terapia gênica na área de doenças neurodegenerativas. Em um caso particular, a retina, parte do sistema nervoso central, está sujeita à doenças neurodegenerativas conhecidas como retinopatias degenerativas ou distrofias retinianas, que também são atualmente alvo para desenvolvimento de terapia gênica.

Exemplos da combinação de um gene adequado a uma determinada patologia neurodegenerativa com um vetor viral seguro, em alguns casos já em

fase de ensaio clínico, podem ser encontrados para o tratamento da doença de Parkinson, da amaurose congênita de Leber e Alzheimer.

Diversos documentos patentários discorrem sobre terapias gênicas para doenças neurodegenerativas. Um exemplo pode ser dado pelo documento  
5 US 6,683,058 que descreve métodos para terapia de doenças neurodegenerativas cerebrais. Nesse documento é descrita uma forma de entrega terapêutica de neurotrofinas para um alvo (neurônios colinérgicos danificados, doentes ou defeituosos). Nele é feita a administração de um transgene codificando uma neurotrofina dentro do cérebro de mamíferos, com  
10 a consequente entrega de uma concentração definida de neurotrofinas recombinantes por período prolongado.

Esse documento se diferencia da presente invenção por descrever um vetor biológico com propriedades terapêuticas para doenças cerebrais envolvendo neurotrofinas, sem qualquer relação com a modificação da  
15 expressão do gene *max* pelo uso desse vetor.

### **Morte Celular Programada (MCP)**

O tratamento de doenças degenerativas em geral, e neurodegenerativas em particular, é frequentemente frustrado pela multiplicidade de fatores que afetam a sensibilidade das células à MCP. Nesses casos, em geral não há um  
20 alvo terapêutico único sensível a fármacos e, por conseguinte, as formas de terapia usual são muito limitadas, com resultados frequentemente insignificantes.

Atualmente não existem tratamentos curativos, ou mesmo paliativos de longo prazo, para a maioria dos casos de doenças neurodegenerativas. Esta  
25 classe de doenças manifesta-se através de aumento nas taxas de MCP em células do sistema nervoso, particularmente neurônios. Seus mecanismos de patogênese podem incluir mutações, como na doença de Huntington, alterações no aporte de oxigênio e nutrientes, como em doenças cerebrovasculares, ou um complexo balanço de múltiplos componentes genéticos e  
30 epigenéticos, como na doença de Alzheimer. A pesquisa nesta área é muito intensa em todo o mundo e concentra-se, por um lado, no estudo dos

mecanismos de morte celular e de citoproteção e, por outro lado, na formulação de estratégias experimentais de recuperação ou preservação funcional de órgãos ou tecidos, visando reduzir o estresse celular e a probabilidade de MCP.

5 Estudos experimentais de mecanismos de MCP na retina de roedores verificaram que neurônios e células progenitoras retinianas apresentam exclusão nuclear de fatores de transcrição, isto é, fatores de transcrição que normalmente são encontrados no núcleo de neurônios saudáveis aparecem no citoplasma destas células quando submetidas a distintas formas de estresse ou  
10 lesão celular [Linden R, Chiarini LB. Nuclear exclusion of transcription factors associated with apoptosis in developing nervous tissue. Braz J Med Biol Res. 1999 Jul;32(7):813-20].

No âmbito patentário, o uso de vetores virais para modulação de MCP pode ser exemplificado pelo documento US 7,256,181. Nele é descrito um  
15 método para o tratamento de câncer pela administração parenteral de interferon- $\beta$  através de um vetor viral para terapia gênica *in vivo*. Sabe-se que interferon- $\beta$  é parte de uma via de indução do gene p53, uma molécula que pode induzir apoptose quando há um dano celular muito grande.

Esse documento não se sobrepõe a presente invenção por se tratar de  
20 terapia gênica para indução, e não bloqueio, de MCP, referindo-se a diversos vetores virais e por utilizar o gene codificante de interferon- $\beta$ , sem qualquer relação com o gene *max*.

Outro exemplo, desta vez feita a partir do potencial de uso de vetores virais nas vias de MCP, pode ser dado pelo documento US 6,998,118. Esse  
25 documento discorre sobre métodos para a transdução neuronal através do vetor rAAV injetado na porção sináptica e transportado ao longo dos axônios dos neurônios até o corpo celular dos mesmos, permitindo expressão de genes não-especificados. No método descrito, são utilizados vetores virais adeno-associados, que são capazes de ser transportados via transporte axonal  
30 retrógrado, para introduzir ou expressar genes nos neurônios, podendo ser aplicado no mapeamento de vias neuronais, na estimulação ou inibição do

crescimento dos neurônios e no tratamento de doenças como Alzheimer, dependendo do gene inserido no vetor.

Como o documento descreve genericamente o uso de terapia gênica para permitir a entrada e expressão de genes em neurônios sem especificar os genes de interesse aplicáveis a cada caso, ele não se sobrepõe à presente invenção, que descreve especificamente um vetor de terapia gênica para controle da neurodegeneração através do controle da expressão do gene *max*.

### **Terapias Neuroprotetoras**

A alternativa mais promissora para combater múltiplos fatores determinantes de patologias neurodegenerativas é o desenvolvimento de terapias neuroprotetoras, isto é as que diminuem, de forma genérica, a sensibilidade das células do sistema nervoso à MCP. Métodos farmacológicos baseados em fatores neurotróficos (uma classe de fatores de crescimento com ação no sistema nervoso) ou outras moléculas neuroprotetoras têm se mostrado pouco eficazes, pois é necessária a administração repetitiva dos fármacos. Isto significa injeções repetidas ou infusão contínua diretamente no tecido nervoso ou no líquido cérebro-raquidiano, para ultrapassar a barreira hemato-encefálica que dificulta ou impede a distribuição de fármacos do sangue para o tecido nervoso. A solução para evitar o risco associado com a manipulação repetitiva do tecido cerebral se encontra no desenvolvimento de terapias baseadas em um número reduzido de intervenções, idealmente uma única, com resultado permanente.

Tal propósito pode ser atingido através do desenvolvimento de terapia genética baseada na descoberta de genes-alvo capazes de proteger o tecido nervoso contra múltiplos fatores determinantes da MCP. Entretanto, a identificação do(s) gene(s) alvo para terapia genética de neurodegenerações não é trivial. Mesmo em casos como a doença de Huntington, não há um gene único sensível a abordagem direta (doenças monogênicas). Nos poucos casos até o momento que parecem impedir a deterioração clínica de pacientes em ensaios genoterapêuticos preliminares, o procedimento é específico para aquela condição, com base na sensibilidade seletiva de uma população

neuronal à presença de um determinado fator neurotrófico ou à expressão de um determinado gene para recuperação funcional de um circuito neuronal específico do sistema nervoso central (SNC).

O alvo da terapia genética pode ser o conjunto de mecanismos de MCP.

5 São conhecidas diversas formas de execução de MCP, disparados em consequência de múltiplos tipos de estresse celular. A mais conhecida é a execução de morte celular por apoptose. Entretanto, os estudos experimentais demonstraram claramente a existência de várias vias distintas de apoptose, bem como outras formas alternativas de MCP. É também conhecido o fato de  
10 que o bloqueio de certas vias de execução de morte celular não impede que células venham a morrer por vias alternativas, que podem ser ativadas, por exemplo, quando do próprio bloqueio da apoptose [Guimarães CA e Linden R - Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem. 2004 May;271(9):1638-50].

15 Alguns procedimentos de terapia genética experimental desenvolvidos até o momento são baseados na introdução ou expressão diferencial (super-expressão) de genes que, se por um lado têm efeito citoprotetor, por outro lado apresentam o potencial para produção de células cancerígenas. Este conflito ocorre pelo fato de que o câncer é, essencialmente, o resultado de um  
20 desequilíbrio entre mecanismos de proliferação e de MCP, em que o bloqueio desta última tem potencial oncogênico. Assim, torna-se um desafio da terapia gênica para doenças neurodegenerativas desenvolver métodos de neuroproteção baseados na expressão de um gene que seja citoprotetor sem ser oncogênico.

25 No âmbito patentário, a importância da manutenção da relação citoproteção/oncogênese pode ser exemplificada pelo documento US 7,186,699 que discorre sobre um vetor viral adeno-associado que codifica VEGF-TRAP, sendo utilizado para entregar e expressar genes codificando um ou mais produtos gênicos anti-angiogênicos ou indutores de MCP, com efeito  
30 anti-tumoral, associado ou não a métodos quimio ou radioterapêuticos.

Esse documento não se sobrepõe à presente invenção por não se referir a expressão de fatores de neuroproteção. Ao contrário, aquela patente refere-se a método de indução de MCP, enquanto o presente documento refere-se à prevenção de MCP.

## 5 **Células ganglionares e o gene *max***

Dentre as diversas populações celulares componentes da retina dos vertebrados, as células ganglionares da retina (RGC) são os neurônios cujos axônios formam o nervo óptico e são responsáveis por transmitir a informação visual processada na retina para os centros superiores do sistema visual. Sua  
10 degeneração provoca cegueira.

De modo geral, os métodos de intervenção terapêutica contra MCP desenvolvidos até o momento agem em etapas relativamente tardias do processo de degeneração celular, quando os mecanismos de execução já são irreversíveis, sem perspectiva de recuperação ou manutenção funcional.  
15 Portanto, novas soluções para intervenção em mecanismos de MCP devem ser dirigidas às etapas mais precoces de transição do estresse celular para o disparo das vias de execução de MCP.

Um estudo demonstrou que o fator de transcrição Max é excluído do núcleo das RGC precocemente após a transecção de seus axônios e,  
20 independentemente da atividade de caspases (proteases envolvidas na morte dos neurônios por apoptose) [Petr-Silva H, de Freitas FG, Linden R, Chiarini LB. Early nuclear exclusion of the transcription factor max is associated with retinal ganglion cell death independent of caspase activity [*J Cell Physiol.* 2004 Feb;198(2):179-87]. Um outro estudo do mesmo grupo examinou mecanismos  
25 da exclusão nuclear de Max e descobriu que a exclusão nuclear dessa proteína é consequência de degradação via sistema de ubiquitina-proteasoma dentro do núcleo das RGCs, acompanhada de retenção da proteína Max recém-sintetizada no citoplasma [Petr-Silva H, Chiarini LB & Linden R – submetido a publicação]. Todos estes processos ocorrem em etapas precoces, antes do  
30 comprometimento das RGCs com os mecanismos de execução de morte celular.

O gene *max* codifica duas isoformas de 21-22 kDa da proteína Max. Max funciona no controle da transcrição de genes dependentes da atividade do fator de transcrição codificado pelo oncogene c-Myc. Para funcionar como fator de transcrição, c-Myc tem de estar heterodimerizado com Max. Por sua vez, Max é capaz tanto de heterodimerização com c-Myc quanto com outras proteínas componentes de uma rede de fatores de transcrição, como Mnt e Mxd1-4 (anteriormente conhecidas como Mad1, Mxi1, Mad3 e Mad4), bem como de homodimerização. Os heterodímeros Myc-Max e os homodímeros Max-Max têm afinidade pelo mesmo elemento no DNA genômico, e têm efeitos antagônicos. Assim, homodímeros Max-Max antagonizam os efeitos oncogênicos dos heterodímeros Myc-Max e, por conseguinte, Max tem efeito anti-oncogênico em células transduzidas com o gene *max*.

No âmbito patentário, alguns documentos descrevem o gene *max* relacionado a vetores virais. O documento US 5,693,487 descreve seqüências nucleotídicas codificando o gene *max*, que resultam em uma proteína hélice-volta-hélice que forma um complexo de ligação com Myc ou Mad, capaz de se ligar a DNA de forma seqüência-específica. Ele se refere à moléculas de ácido nucléico que são capazes de hibridizar sob determinadas condições a determinadas seqüências nucleotídicas de cDNAs de *max* ou a seqüências nucleotídicas de cDNAs de *mad*. O polipeptídeo Max, quando associado aos polipeptídeos Myc ou Mad é capaz de se ligar a seqüências nucleotídicas contendo CACGTG.

O documento US 5,302,519 descreve uma seqüência nucleotídica que codifica o polipeptídeo Mad, capaz de se ligar ao polipeptídeo Max e inibir a ligação de Max à seqüência nucleotídica CACGTG.

Nenhum dos documentos descritos se sobrepõe à presente invenção pois os mesmos tratam da interação de seqüências nucleotídicas específicas do gene *max* com outras seqüências e referem-se à expressão do polipeptídeo Max exclusivamente relativa à sua interação com outros polipeptídeos e seus efeitos sobre ligação a uma seqüência específica de DNA.

O documento US 5,512,473 refere-se à sequência nucleotídica e expressão de polipeptídeo Mxi1, que interage com o polipeptídeo Max.

O documento não se sobrepõe à presente invenção, por tratar-se de outra sequência de DNA e outro polipeptídeo que interage com Max.

5 Já os documentos US 5,811,298 e US 6,140,476 discorrem sobre vetores plasmidiais ou virais contendo um gene quimérico composto pela sequência codificante de um domínio repressor do gene Mxi, fundida com a sequência que codifica o gene Max. O gene quimérico expressado por estes vetores codifica uma proteína de fusão denominada Rep-Max, que bloqueia  
10 especificamente a atividade promotora de tumores das proteínas oncogênicas da família c-Myc. Os documentos citados não se sobrepõe à presente invenção por: a) tratarem de uma construção de fusão Mxi-Max, incluindo apenas os domínios bHLH, LZ e carboxi-terminal de Max, isto é, sem o domínio 5'ORF do gene *max* que codifica o domínio N-terminal de Max dotado, por exemplo, de  
15 sítios de fosforilação da proteína Max, ou seja, uma construção fundamentalmente distinta da construção Max empregada na presente invenção; (b) referirem-se ao efeito repressor do domínio do polipeptídeo Mxi, em lugar do efeito do polipeptídeo Max descrito na presente invenção; (c) referirem-se especificamente ao efeito repressor do domínio Mxi sobre a  
20 atividade tumorigênica das oncoproteínas c-Myc, distinto do efeito neuroprotetor de Max descrito na presente invenção; (d) referirem-se ao efeito do polipeptídeo Max exclusivamente como facilitador do efeito repressor do domínio Mxi do polipeptídeo de fusão, distinto do efeito direto do polipeptídeo Max descrito na presente invenção; (e) referirem-se à atividade anti-oncogênica  
25 dos vetores contendo a construção quimérica *rep-max*, distinta da atividade neuroprotetora dos vetores contendo *max* descritos na presente invenção.

Os documentos descritos não se sobrepõe à presente invenção por tratarem de uma quimera utilizando o gene *max* e não do vetor contendo o gene *max* em si. Além disso, o referido documento não cita a adição do gene  
30 *max* a vetores virais a fim de modular a expressão desse gene com finalidade citoprotetora.

Não foram encontrados documentos citando vetores de clonagem contendo o gene *max*, vetores de transporte contendo o gene *max* e/ou seu uso em terapia citoprotetora, especialmente neurodegenerativa.

5 A presente invenção está relacionada a construções de vetores de clonagem contendo o gene *max*. Especialmente, a presente invenção trata da introdução dos vetores de clonagem contendo o gene *max* nas células utilizando vetores de transporte. Adicionalmente, a presença de vetores de clonagem contendo o gene *max* nas células permite a expressão diferencial do gene *max* nas mesmas células. Adicionalmente, a presente invenção refere-se  
10 à expressão diferencial do gene *max* como atividade citoprotetora, especialmente neuroprotetora, podendo ser aplicada a terapêutica médica e veterinária para condições de neurodegeneração.

### **Objeto da Invenção**

15 É um objeto da presente invenção vetores biológicos compreendendo o gene *max* compreendendo:

a) um vetor de clonagem compreendendo:

a.1) uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene *max* ou seus fragmentos;

20 a.2) um promotor adequado;

b) vetores de transporte, escolhidos do grupo que compreende vetores de transporte virais, vetores de transporte não-virais e mistura dos mesmos.

Em uma realização preferencial, o vetor de clonagem de a) compreende vetores do grupo de plasmídeos, vírus, cosmídeos e/ou YACs.

25 Em uma realização preferencial, o promotor de b) é qualquer seqüência capaz de promover a expressão do gene *max* e/ou seus fragmentos em uma célula.

Em uma realização preferencial, o promotor é preferencialmente escolhido do grupo que compreende promotores CBA, CMV e/ou híbridos  
30 CBA/CMV e/ou promotores específicos para cada um dos diversos tipos celulares.

Em uma realização preferencial, o promotor é escolhido do grupo de promotores específicos para neurônios.

Em uma realização preferencial, os vetores de transporte não-virais são escolhidos do grupo que compreende plasmídeos, lipossomos, compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica como DNA-fosfato de cálcio, DNA-DEAE dextran, DNA-lípide, DNA-proteína, DNA-lípide-proteína, HACs (cromossomos artificiais), nanopartículas, microinjeção, eletroporação, injeção de plasmídeo, injeção balística de DNA.

Em uma realização preferencial, os vetores de transporte virais são escolhidos do grupo que compreende adenovírus, vírus adeno-associados, vírus adeno-associados recombinantes, retrovírus, vírus da herpes, lentivirus, HIV, vaccinia.

É um objeto adicional da presente invenção um método de produção de vetores biológicos compreendendo o gene *max* compreendendo as etapas de:

- 15 a) prover um vetor de clonagem compreendendo:
  - a.1) uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene *max* ou seus fragmentos;
  - a.2) um promotor adequado;
- b) prover um vetor biológico escolhido dentre vetores de transporte virais, vetores de transporte não-virais e mistura dos mesmos;
- 20 c) contactar o vetor biológico de b) e o vetor de clonagem de a).

É um objeto adicional da presente invenção um método de expressão do gene *max* em células compreendendo a etapa de contactar o vetor biológico com uma célula-alvo adequada, onde o vetor biológico compreende:

- 25 a) um vetor de clonagem compreendendo:
  - a.1) uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene *max* ou seus fragmentos;
  - a.2) um promotor adequado;
- b) vetores de transporte, escolhidos do grupo que compreende vetores de transporte virais, vetores de transporte não-virais e mistura dos mesmos.
- 30

Em uma realização preferencial, o vetor biológico está presente em um veículo farmacologicamente aceitável escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmacologicamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimentos de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

Em uma realização preferencial, a célula é um neurônio de um animal superior como, por exemplo, o homem.

É um objeto adicional da presente invenção um método de terapia gênica compreendendo as etapas de introdução de um vetor biológico contendo o gene *max* em pelo menos uma célula-alvo, onde a expressão diferencial do gene *max* na célula-alvo irá promover a modulação da atividade celular.

Em uma realização preferencial, a modulação da atividade celular tem função citoprotetora.

Em uma realização preferencial, a célula é um neurônio de um animal superior como, por exemplo, o homem.

## **Descrição das Figuras**

A Figura 1 mostra uma esquematização do vetor de transporte pTR-CBA-max.

A Figura 2 mostra uma esquematização do vetor de transporte pTR-SB-smCBA-max.

A Figura 3 mostra uma esquematização do vetor de transporte pHpa-trs-SK-max.

A Figura 4 mostra a neuroproteção *in vitro* por rAAV-Max. Ratos neonatos (no primeiro dia pós-natal) receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos e pTR-CBA-GFP no outro olho. Após 14 dias, os animais foram anestesiados terminalmente, os olhos foram removidos e as retinas foram dissecadas. Explantes de tecido retiniano de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> foram

cortados e mantidos em meio de cultura com 5% de soro fetal bovino por 30 horas, após o que o tecido foi fixado com paraformaldeído 4%. A taxa de morte celular na camada de células ganglionares da retina foi estimada pela percentagem de perfis picnóticos, indicativos de morte celular por apoptose, em relação ao número total de células na área de amostragem (dados individuais no inserto, médias e erros padrão da média no histograma principal). Os explantes de retina transduzida com rAAV-max tiveram taxas de morte celular aproximadamente 50% menores que os explantes transduzidos com o rAAV-GFP controle. A expressão aumentada de Max foi confirmada por imunohistoquímica, enquanto a expressão de GFP foi confirmada pela fluorescência intrínseca da proteína controle.

A Figura 5 mostra a neuroproteção *in vivo* por rAAV-Max. Ratos foram distribuídos em 4 grupos experimentais conforme o esquema acima. Dois grupos receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos, respectivamente no primeiro ou no 60º dia de idade pós-natal. Tres grupos receberam lesões do nervo óptico no 60º dia pós-natal (do lado injetado quando foi o caso) e todos os 4 grupos foram sacrificados por anestesia profunda terminal no 74º dia pós-natal. Após fixação com paraformaldeído 4%, os olhos foram removidos e as retinas inteiras foram montadas como montagens planas em lâminas de vidro gelatinizadas para adesão do tecido fixado. Núcleos de células vivas ou perfis picnóticos indicativos de morte celular foram corados com o intercalante de DNA sytox green, que marca com fluorescência verde o DNA e quantificados na camada de células ganglionares por contagens em fotomicrografias obtidas por microscopia confocal. As contagens foram transformadas em densidades de núcleos (células) e os resultados apresentados na forma de médias e erros padrão da média. A linha interrompida horizontal indica a densidade média de células amácrinas deslocadas (em cinza), encontradas na camada de células ganglionares no rato, que foi descontada do total para estimar a densidade de células ganglionares (em preto). As retinas transduzidas com rAAV-max no 1º dia pós-natal foram protegidas contra a morte das células ganglionares. As retinas

transduzidas no mesmo dia do esmagamento do nervo não apresentaram proteção significativa, devido ao tempo necessário para expressão de transgene veiculado por vetor pTR-CBA-max (aproximadamente 14 dias).

A Figura 6 mostra outro exemplo de neuroproteção *in vivo* por rAAV-  
5 Max. Ratos foram distribuídos em 4 grupos experimentais conforme o esquema. Todos os animais receberam no primeiro dia pós-natal injeções múltiplas nos colículos superiores (alvos de projeção dos axônios das RGC) de uma suspensão de microesferas fluorescentes (vermelhas), que são transportadas ao longo dos axônios até o corpo celular das RGC. Este  
10 procedimento serve para identificar positivamente este tipo de neurônio, modelo de neurodegeneração no SNC. Tres grupos receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos, no 30º ou no 60º dia de idade pós-natal. Tres grupos receberam lesões do nervo óptico (*crush*) no 60º dia pós-natal (do lado injetado quando foi o caso) e todos os 4 grupos foram sacrificados por  
15 anestesia terminal no 74º dia pós-natal. Após fixação com paraformaldeído 4%, os olhos foram removidos e as retinas inteiras foram dissecadas e preparadas como montagens planas em lâminas de vidro gelatinizadas para adesão do tecido fixado. As RGC foram identificadas pela marcação vermelha com as microesferas, quanquanto todos os núcleos de células da camada de células  
20 ganglionares foram marcados com o intercalante de DNA sytox green (verde). As RGC foram quantificadas por contagens em fotomicrografias obtidas por microscopia confocal. As contagens foram transformadas em densidades de núcleos (células) e os resultados apresentados na forma de médias e erros padrão da média. Novamente a transdução prévia (com antecedência de 30  
25 dias) das RGCs produziu neuroproteção. (Petrs-Silva et al, resultados inéditos)

### **Descrição Detalhada da Invenção**

Os exemplos a seguir não têm o intuito de limitar o escopo da invenção, mas sim de somente ilustrar uma das inúmeras maneiras de se realizar a  
30 invenção.

Entende-se por “vetores de clonagem” os vetores capazes de amplificar a informação genética de um fragmento de DNA inserido em um DNA exógeno e podem ser selecionados do grupo que compreende plasmídeos, vírus, cosmídeos e/ou YACs. Os vetores de clonagem possuem um promotor que é uma sequência capaz de promover a expressão da sequência de DNA na célula desejada. O promotor é preferencialmente escolhido do grupo que compreende promotores CBA, CMV e/ou híbridos CBA/CMV e/ou promotores específicos para determinados tipos de células-alvo como, por exemplo, promotores específicos para neurônios.

Entende-se por “vetores de transporte” os veículos de entrega de informação genética para células alvo contendo o vetor de clonagem e podem ser selecionados do grupo que compreende os vetores de transporte virais e vetores de transporte não-virais.

Entende-se por “vetores de transporte virais” o grupo que compreende adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, vírus da herpes, lentivirus, HIV, vaccinia.

Entende-se por “vetores de transporte não-virais” o grupo que compreende plasmídeos, lipossomos, compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica como DNA-fosfato de cálcio, DNA-DEAE dextran, DNA-lípide, DNA-proteína, DNA-lípide-proteína, HACs (cromossomos artificiais), nanopartículas, microinjeção, eletroporação, injeção de plasmídeo, injeção balística de DNA.

Entende-se por “vetores biológicos” aquele(s) vetor(es) de clonagem inserido(s) em pelo menos um vetor de transporte.

Entende-se por “farmaceuticamente aceitável” uma formulação contendo excipientes e carreadores farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos por técnicos no assunto, como é o desenvolvimento de doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimentos de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intravítreo e intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular e sua administração e/ou formulação.

Entende-se por “células-alvo” as células que serão beneficiadas pela expressão do gene *max*. Tais células incluem células de animais superiores como, por exemplo, neurônios.

Entende-se por “modulação da atividade” qualquer modificação na expressão de elementos como DNA, RNA e/ou proteínas nas células-alvo e/ou qualquer modificação no comportamento dessas células durante e/ou após a expressão do gene *max* nas células-alvo, com o intuito de promover tanto a superexpressão do gene *Max*, quanto o seu silenciamento. Em especial, na presente invenção a modulação será com o intuito de promover a superexpressão do gene *max*.

#### **Exemplo 1 - Construção dos plasmídeos:**

Os cDNAs para *max21* e *max22* foram gentilmente cedidos por Robert N. Eisenman (Fred Hutchinson Cancer Research Center – Seattle, Washington).

Os plasmídeos principais de rAAV são construídos baseados no plasmídeo pTR-UF 11, que foi gentilmente cedido por William Hauswirth (Universidade da Florida – Gainesville, Florida). Nas construções, os transgenes, flanqueados pelos ITRs (inverted terminal repeats) do AAV2, têm sua expressão controlada pelo promotor CBA (chicken  $\beta$ -actin) que vem a ser um híbrido do enhancer immediate early de CMV (citomegalovírus) com 381 pares de base, com o promotor do CBA (chicken- $\beta$ -actin) - exon 1 - intron 1, com 1352 pares de base. Toda essa seqüência é seguida por um sinal de poliadenilação do SV-40.

A combinação CBA-CMV produz grande eficiência de transdução nas células da retina, principalmente nas células ganglionares. Entretanto, a combinação de promotor e enhancer pode ser, eventualmente, modificada para adequação a outros tipos celulares, particularmente outros tipos de neurônios, sem prejuízo do conteúdo da presente invenção.

Os procedimentos utilizados aplicam-se, por exemplo, mas não exclusivamente, a outros plasmídeos como: (a) pTR-SB-smCBA, que não contém a seqüência codificante do gene de resistência bacteriana à neomicina,

seu promotor eucariótico HSV-tk, o enhancer PYF441 de vírus polioma e o sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino, o que torna os vetores derivados deste plasmídeo capazes de uso em ensaios clínicos em seres humanos; (b) pHpa-trs-SK, que é um vetor de rAAV contendo dupla fita de DNA, distinto dos vetores base acima. O vetor base pHpa foi cedido ao grupo pelo Dr. William Hauswirth, da Universidade da Florida, que o recebeu do Dr J. Samulski (Universidade da Carolina do Norte - EUA), e sua construção tem como objetivo acelerar a expressão do transgene pela formação de um vetor contendo dupla fita de DNA, pulando a etapa de síntese da fita complementar que é relativamente lenta. Nesse caso, o promotor é CMV (citomegalovirus), porém pode ser substituído por outros promotores, conforme a necessidade. Experimentos em nosso laboratório mostram que este tipo de vetor expressa o transgene na retina em até 7 dias, isto é, reduzindo em 50% o tempo necessário para expressão do transgene.

15

### **Exemplo 2 - Preparação dos plasmídeos pTR-CBA-max21 e pTR-CBA-GFP**

Um *pfu* (1,5U/ 50µl de reação) polimerase (Stratagene) foi usada em PCR (*polimerase chain reaction*) para gerar o clone de *max* flanqueado pela seqüência de clivagem da enzima de restrição *NotI*. Foram utilizados o par de primers: *forward* (5'-gcggccgcatgagcgataacgat-3') e *reverse* (5'-gcggccgcttagctggcctccat-3'). O clone gerado foi inserido no plasmídeo ponte TOPO, seguindo o protocolo e os reagentes do *kit* (TOPO TA Cloning Kit - Invitrogen). O gene de *GFP* (*green fluorescent protein*) é utilizado rotineiramente como controle experimental e já estava flanqueado pela seqüência de clivagem de *NotI* no plasmídeo ponte pBIISK. Os plasmídeos contendo o inserto foram digeridos com a enzima *NotI* (Promega), na concentração de 1U/µg de DNA por 1 hora na estufa a 37°C. Os fragmentos gerados foram purificados a partir de gel de agarose com o *kit DNA cleaner* (Invitrogen).

30

Os clones, agora com terminação coesiva por *NotI*, foram então ligados no plasmídeo pTR-UF, previamente digeridos também com *NotI*, desfosforilado

por 30 minutos com SAP (*shrimp alkaline phosphatase* – Promega, 5U/μg DNA) a 37°C, inativados por 10 minutos a 75°C, purificados com fenol-clorofórmio (Sigma) e precipitados com 3 vezes o volume da amostra de etanol 80% e 10% do volume da amostra de acetato de sódio 3M. A reação de ligação foi realizada *overnight* com 1μl da enzima T4 DNA ligase (20,000U/ml - Promega) em um volume final de reação de 20μl, em banho de gelo, com a temperatura começando com 13°C e terminando com 20°C. Do produto da ligação, 4μl foram utilizados para transformar 50μl de bactérias *recA<sup>-</sup>* e *recB<sup>-</sup>* eletrocompetentes, (SURE cells - Stratagene) por eletroporação (25μFD, 200Ohms e 1,25Kvolts). As bactérias foram então incubadas por 1 hora em meio LB (1% NaCl, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura) sem antibiótico no agitador a 200 rpm, a 37°C e, em seguida, foram espalhadas em placa de LB-agar (1% NaCl, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 1,5% Agar) acrescido de ampicilina (50μg/ml) onde cresceram por 14 horas em estufa, a 37°C, de forma a gerar colônias isoladas.

As colônias selecionadas pelo antibiótico ampicilina foram crescidas em suspensão em 5ml de LB acrescido de ampicilina por 14 horas no agitador a 200rpm a 37°C, para obtenção de quantidade suficiente de plasmídeo para análise. As bactérias em suspensão foram utilizadas para purificação dos plasmídeos com o kit mini-prep *Wizard-plus* (Promega). Os plasmídeos foram analisados quanto à presença e orientação do clone por seqüenciamento do DNA, utilizando o par de *primers* para a seqüência do plasmídeo pTR-UF: *forward* (5'-tcttttctacagctcctgggcaa-3') e *reverse* (5'-gcattctagttgtggttgccaaa-3'). Os plasmídeos foram também digeridos com a enzima de restrição *SmaI* (Promega) na concentração de 1U/μg de DNA, a temperatura ambiente por 1 hora, para confirmar a presença do clone, da sua orientação e dos ITRs, que, por serem seqüências repetitivas, são facilmente excluídas dos plasmídeos pelas bactérias em culturas prolongadas.

### **Exemplo 3 - Produção dos plasmídeos**

Para transfecção em larga escala, que é necessária para produção eficiente dos vetores virais, faz-se necessária uma grande quantidade tanto do plasmídeo principal quanto do plasmídeo auxiliar pDG altamente purificados. Como mencionado acima, o plasmídeo auxiliar contém somente sequências  
5 mínimas requeridas para empacotamento e dispensa a presença de adenovírus como vírus auxiliar do processo de empacotamento.

### Exemplo 3.1 - **Maxi-Prep**

Colônias de bactérias contendo as construções de interesse foram crescidas em suspensão em 5ml de meio LB acrescido de ampicilina, no  
10 agitador a 200 rpm, por 5h e então foram passadas para 1L de meio TB (1,2% Triptona, 2,4% extrato de levedura e 0,4% glicerol) acrescido de 10% tampão KHPO e 0,1% ampicilina (100mg/ml) pré-aquecido a 37°C. As colônias em meio LB permaneceram no agitador, a 37°C por mais 14h. Para precipitar as  
15 bactérias, o meio foi centrifugado por 10 minutos, a 4000 rpm, no rotor JA-10. Para cada 250ml de meio centrifugado foi acrescentado 20ml de solução de ressuspensão (50mM Tris-HCl, pH8,0, 10mM EDTA, pH 8,0, 20µg/ml RNAse) no *pellet* de bactéria formado e foram dissociadas com auxílio de pipetador. Em seguida foi adicionada 20ml de solução para lisar a bactéria, preparada antes do uso (0,2N NaOH, SDS 1% (w/v)). A mistura foi agitada e incubada por 5  
20 minutos a temperatura ambiente. Por último, 20ml da solução de neutralização (3M acetato de potássio, de ácido acético 28,7% (w/v)) foi adicionada e agitada. A mistura foi colocada no gelo por 10 minutos e então centrifugada por mais 10 minutos, a 8000 rpm, em rotor JA-10. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 0,6 volumes de isopropanol, misturado e incubado no gelo  
25 por no mínimo 20 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 20 minutos, a 10.000 rpm, em rotor JA-10. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 10 ml de etanol 80% e deixado na bancada até secar.

### Exemplo 3.2 - **Purificação por CsCl**

Depois de seco, o *pellet* foi solubilizado cuidadosamente em 10 ml de TE  
30 (100mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM EDTA pH 8,0) com auxílio de pipetador. Em seguida foi adicionado 1g de cloreto de cézio para cada ml de solução. A

solução foi transferida para tubos de ultracentrifuga (25,4 X 89,1 mm, *Quick-Seal* - Beckman) e foi adicionado 100µl de brometo de etídio (740µg/ml). (Invitrogen). Os tubos foram selados e centrifugados *overnight*, a 45,000 rpm, no rotor Vti-65. Após centrifugação a banda mais baixa no tubo, corada com brometo de etídio foi removida com uma seringa e agulha calibre nº 18. O DNA foi lavado 3X com butanol saturado em H<sub>2</sub>O. Foram adicionados 2,5X do volume original de DNA, de H<sub>2</sub>O, e 2X do volume total, de etanol, incubado no gelo, por 20 minutos e centrifugado por 20 minutos, a 15,000 rpm, no rotor JA-10. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com etanol 80%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 1-2ml de H<sub>2</sub>O.

#### **Exemplo 4 - Dosagem dos plasmídeos**

A concentração de DNA foi medida por absorção de UV (ultravioleta) por espectrofotometria. 5µl do DNA foi adicionado em 995µl de H<sub>2</sub>O e a densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 260nm. A concentração do DNA, em µg/µl de amostra, será 10X a leitura óptica. Para analisar a pureza da amostra, foi feita uma segunda dosagem no comprimento de onda de 280nm. Foi determinada a razão entre as leituras a 260nm e 280nm. Se a relação está entre 2 e 1,5 os plasmídeos podem ser usados para transfecção. Abaixo de 1,5, eles devem ser novamente purificados.

#### **Exemplo 5 - Cultura de células**

Células de rim de embrião humano (HEK-293) foram mantidas em meio completo, DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Gibco) complementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - Gibco), 100 U/ml penicilina G (Gibco) e 100 mg/ml streptomina (Gibco). A cultura permaneceu na estufa numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. As células foram passadas de 1:3 garrafas a cada 3 dias, utilizando PBS para lavagem e 0,05% de tripsina/0,53mM EDTA in HBSS (Gibco) para dissociar as células. Para produção de cada vetor, fazia-se uma transfecção em larga escala. Para cada transfecção era utilizada uma *cell factory* (NUNC), que vem a ser uma câmara de 6,320cm<sup>2</sup> com 10 prateleiras. Um dia antes da transfecção, as células eram

passadas de 1 para 3 *cell factories*, assim, no dia da transfecção elas estariam com uma confluência de 75 –80%, representando um total de  $1 \times 10^9$  células.

### **Exemplo 6 - Transfecção**

A transfecção foi feita por precipitação com fosfato de cálcio. Foi  
5 misturado 1,8 mg do plasmídeo auxiliar pDG e 0,6 mg do plasmídeo principal,  
de forma a compor uma taxa molar de 1:1 de DNA, em 50ml de  $\text{CaCl}_2$  0,25M,  
seguido da adição de 50ml de 2X HBS, pH 7,05 (250mM HEPES-free acid,  
1,4M NaCl e 14mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). É importante que a solução de 2X HBS seja  
adicionada por último. A mistura foi incubada por 1 a 2 minutos à temperatura  
10 ambiente e então adicionada a 1100ml de meio completo. O meio da cultura de  
células foi removido e o novo meio foi adicionado. As células ficaram incubadas  
por 72 h. No final desse período, o meio de cultura foi descartado, as células  
lavadas com PBS e dissociadas em solução de PBS contendo 5mM EDTA. As  
células foram então centrifugadas a 1000g por 10-15 minutos; o sobrenadante  
15 foi descartado, o *pellet* ressuspenso em 60 ml de solução de lise (150mM NaCl,  
50mM Tris-HCl, pH8,4) e estocado a  $-20^\circ\text{C}$  até a purificação dos vetores.

### **Exemplo 7 - Purificação dos vírus**

#### **Exemplo 7.1 - Lise celular e gradiente de iodixanol**

As células foram lisadas por 3 ciclos de congelamento, em gelo seco  
20 com etanol, e descongelamento em banho a  $37^\circ\text{C}$ . Benzonase (Sigma) foi  
então adicionada na concentração final de 50U/ml e incubada por 30 minutos,  
no banho a  $37^\circ\text{C}$ . O lisado foi então centrifugado a 4000g, por 20 minutos e o  
sobrenadante contendo os vetores virais foi dividido em 4 gradientes de  
Iodixanol (5, 5'-[(2-hydroxy-1,3-propanediyl)bis(acetyl-1,3-  
25 benzenecarboxamide)] (OptiPrep - Axis-Shield). O Iodixanol é um meio não  
iônico para formação de gradiente de densidade, que permanece isosmótico  
em todas as densidades e tem sido muito efetivo na purificação de vetores  
virais, evitando a perda de infectividade e a toxicidade do cloreto de césio ou  
da sacarose (Zolotukhin, S. et al, 1999). A densidade do rAAV é em torno de  
30 1,266g/ml, que é equivalente a 50% da solução de Iodixanol. Sendo assim, é  
gerado um gradiente descontínuo em tubos (28,8 X 107,7 mm, *Quick-seal* -

Beckman). Foi colocado 15ml do lisado celular, que é o menos denso, seguido de 5ml de iodixanol (Sigma) 15% diluído em PBS-MK (PBS contendo 1mM  $MgCl_2$  e 2,5mM KCl), 15ml de iodixanol 25%, 5ml de iodixanol 40% e, por fim, 15ml de iodixanol 60%. Os tubos foram então selados e centrifugados no rotor tipo 70 Ti, a 69,000 rpm (350,000g) por 1 hora a 18°C. Aproximadamente 5ml foi aspirado da interfase formada entre 40-60%, com uma seringa e agulha calibre nº 18. Esse material pode ser estocado na geladeira ou congelado até a realização da cromatografia.

#### Exemplo 7.2 – Cromatografia

10 A fração obtida pelo gradiente de iodixanol foi então purificada e concentrada por cromatografia em coluna. Para isso foi utilizada a coluna de heparina HiTrap de troca iônica com 5ml (Pharmacia), no sistema de FPLC ATKA (Pharmacia), correndo 1 volume de coluna (5ml) por minuto e eluindo com PBS-MK adicionado de 0,5M NaCl. A coluna foi inicialmente equilibrada a 15 5ml/min com 25ml de tampão A (20mM Tris-HCl, 15mM NaCl, pH 8,5) e então com 25ml de tampão B (20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 8,5), seguido de 25ml de tampão A, novamente. A fração de vetor em iodixanol foi diluída 1:1 em tampão A e aplicada à coluna, que teve uma taxa de fluxo de 3-5 ml/min. Após a amostra ter passado pela coluna HiTrap, ela foi então lavada com 50ml 20 de tampão A. O vetor foi eluído em tampão B e fracionado em aproximadamente 50 frações de 1ml e as frações contendo o vetor foram recolhidas. O vetor foi então concentrado e dessalinizado em um concentrado Biomax 100K (Millipore) por 3 ciclos de centrifugação em microcentrifuga à velocidade máxima de 14000 rpm por 1 minuto. Em cada ciclo o vírus foi 25 concentrado a 1ml seguido da adição de 10ml de Ringer Lactato. Os vetores de AAV foram estocados a -80°C.

#### Exemplo 8 - Análise das proteínas do AAV:

Exemplo 8.1 - **Extração de proteínas:** 15µl de cada estoque de vírus foi misturado a tampão de amostra (45% de glicerol 100%, 5% de 2-β-mercapto-etanol, 2% de SDS em Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e uma pitada de Azul de 30

Bromophenol), fervido por 5 minutos e aplicado no gel de 12% de poliacrilamida (Bio-Rad).

Exemplo 8.2 - **Coloração por prata:** Os estoques dos vetores foram avaliados quanto a sua pureza pela análise das proteínas totais do estoque através da coloração do gel de poliacrilamida por prata usando as soluções e seguindo o protocolo do *kit* da Bio-Rad.

### Exemplo 9 - Titulação

O estoque de vetor purificado foi tratado com Dnase I para digerir qualquer DNA contaminante não empacotado. 10µl do estoque do vetor purificado foi incubado com 10U de Dnase I (Boehringer) em 100µl de mistura de reação, (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>) por 1 hora, a 37°C. Ao final da reação, 10µl de tampão de proteinase K 10X (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 1% SDS) foi adicionado, seguido da adição de 1µl de Proteinase K (18,6mg/ml, Boehringer). A mistura foi incubada a 42°C por 1 hora. O DNA viral foi purificado por 2 extrações com fenol/clorofórmio, seguido por uma extração com clorofórmio e precipitação com etanol *overnight* a -20°C, usando 10µg de glicogênio como carreador. A mistura foi então centrifugada em microcentrífuga por 30 minutos, à velocidade máxima de 14000 rpm. O DNA precipitado foi ressuspensão em 100µl de água. Cada mistura de reação do PCR tinha 1µl do DNA viral, diluído em duas séries de diluições do plasmídeo padrão, que pode ser o plasmídeo principal utilizado para produzir o vetor viral com concentração determinada, porém com transgene diferente do transgene contido no vetor. Através dele foi comparada a quantidade do DNA. A melhor taxa desse padrão fica entre 1 a 100pg, sendo usadas diluições equivalentes a taxa de expressão de 1, 10, 50 e 100pg. Foi utilizado um par de *primers* referente à seqüência logo acima e abaixo de onde o transgene foi inserido: *forward* (5'-agttattaatagtaatacaatta-3') e *reverse* (5'-atccttcagggtattccagta-3'). Os produtos de cada reação foram analisados em gel de 2% de agarose (Invitrogen) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5µg/ml de solução. A corrida foi realizada até que as duas bandas fossem resolvidas, de

forma a podermos compará-las. A imagem das bandas de DNA coradas pelo brometo de etídio no gel foi digitalizada usando um sistema de armazenamento de imagem (ImageStore 7500 UVP – BioRad). A densidade de cada banda foi medida usando um programa de análise de imagem (ZERO-Dscan Image Analysis System, version 1.0 – Scanalytics). As taxas foram plotadas como uma função da concentração do DNA padrão. Onde o número de moléculas de DNA viral se igualava ao número de moléculas do DNA do competidor, representava a concentração do estoque do vetor viral.

**Exemplo 10 - Vetor pTR-CBA-max (Figura 1):** Construído sobre vetor base rAAV sorotipo 2 (pTR), contém gene de resistência a neomicina para seleção e promotor CBA (*chicken beta-actin*) geral, capaz de promover a expressão de *max* em qualquer tipo de célula. Vetores de AAV têm expressão relativamente lenta, atingindo o máximo de expressão do transgene somente cerca de 14 dias após a transfecção. O vetor pTR-CBA-max reduziu a sensibilidade de RGC à morte celular após transecção dos seus axônios em experimentos *in vitro* e *in vivo*.

**Exemplo 10.1 – Sensibilidade de RGC à morte celular após transecção dos seus axônios em experimentos *in vitro***

Transdução de *max* em células ganglionares. Ratos neonatos (no primeiro dia pós-natal) receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos. Após 14 dias, os animais foram anestesiados terminalmente, os olhos foram removidos e fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato. Os olhos foram cortados em criostato e cortes de 10 micrômetros de espessura foram montados em lâminas de vidro para processamento imunohistoquímico. A proteína Max foi detectada por reação com um anticorpo específico, seguido de revelação com anticorpo secundário fluorescente (vermelho). A proteína beta-tubulina de classe III, que marca RGC, foi detectada por um anticorpo específico seguido de revelação com anticorpo fluorescente (verde). Fotomicrografias foram obtidas por microscopia confocal a laser. O conteúdo de proteína Max está claramente aumentado nas RGC transduzidas com pTR-CBA-max (mod. de Petrs-Silva et al, 2005).

Neuroproteção *in vitro* por rAAV-Max: Ratos neonatos (no primeiro dia pós-natal) receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos e pTR-CBA-GFP (controle) no outro. Após 14 dias, os animais foram anestesiados terminalmente, os olhos foram removidos e as retinas foram dissecadas.

5 Explantes de tecido retiniano de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> foram cortados e mantidos em meio de cultura com 5% de soro fetal bovino por 30 horas, após o que o tecido foi fixado com paraformaldeído 4%. A taxa de morte celular na camada de células ganglionares da retina foi estimada pela percentagem de perfis picnóticos, indicativos de morte celular por apoptose, em relação ao  
10 número total de células na área de amostragem (dados individuais no inserto, médias e erros padrão da média no histograma principal). Os explantes de retina transduzida com rAAV-max tiveram taxas de morte celular aproximadamente 50% menores que os explantes transduzidos com o rAAV-GFP controle (Figura 4). A expressão aumentada de Max foi confirmada por  
15 imunohistoquímica, enquanto a expressão de GFP foi confirmada pela fluorescência intrínseca da proteína controle. (Petr-Silva et al, resultados inéditos)

#### Exemplo 10.2 – Sensibilidade de RGC à morte celular após transecção dos seus axônios em experimentos *in vivo*

20 Neuroproteção *in vivo* por rAAV-Max: Ratos foram distribuídos em 4 grupos experimentais conforme o esquema da figura 5. Dois grupos receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos, respectivamente no primeiro ou no 60º dia de idade pós-natal. Tres grupos receberam lesões do nervo óptico no 60º dia pós-natal (do lado injetado quando foi o caso) e todos os 4 grupos  
25 foram sacrificados por anestesia profunda terminal no 74º dia pós-natal. Após fixação com paraformaldeído 4%, os olhos foram removidos e as retinas inteiras foram montadas como montagens planas em lâminas de vidro gelatinizadas para adesão do tecido fixado. Núcleos de células vivas ou perfis picnóticos indicativos de morte celular foram corados com o intercalante de  
30 DNA sytox green, que marca com fluorescência verde o DNA e quantificados na camada de células ganglionares por contagens em fotomicrografias obtidas

por microscopia confocal. As contagens foram transformadas em densidades de núcleos (células) e os resultados apresentados na forma de médias e erros padrão da média. A linha interrompida horizontal indica a densidade média de células amácrinas deslocadas (em cinza), encontradas na camada de células ganglionares no rato, que foi descontada do total para estimar a densidade de células ganglionares (em preto). As retinas transduzidas com rAAV-max no 1º dia pós-natal foram protegidas contra a morte das células ganglionares. As retinas transduzidas no mesmo dia do esmagamento do nervo não apresentaram proteção significativa, devido ao tempo necessário para expressão de transgene veiculado por vetor pTR-CBA-max (aproximadamente 14 dias). (Petr-Silva et al, resultados inéditos)

Neuroproteção *in vivo* por rAAV-Max: Ratos foram distribuídos em 4 grupos experimentais conforme o esquema da figura 6. Todos os animais receberam no primeiro dia pós-natal injeções múltiplas nos colículos superiores (alvos de projeção dos axônios das RGC) de uma suspensão de microesferas fluorescentes (vermelhas), que são transportadas ao longo dos axônios até o corpo celular das RGC. Este procedimento serve para identificar positivamente este tipo de neurônio, modelo de neurodegeneração no SNC. Tres grupos receberam injeções de pTR-CBA-max em um dos olhos, no 30º ou no 60º dia de idade pós-natal. Tres grupos receberam lesões do nervo óptico (*crush*) no 60º dia pós-natal (do lado injetado quando foi o caso) e todos os 4 grupos foram sacrificados por anestesia terminal no 74º dia pós-natal. Após fixação com paraformaldeído 4%, os olhos foram removidos e as retinas inteiras foram dissecadas e preparadas como montagens planas em lâminas de vidro gelatinizadas para adesão do tecido fixado. As RGC foram identificadas pela marcação vermelha com as microesferas, quanquanto todos os núcleos de células da camada de células ganglionares foram marcados com o intercalante de DNA sytox green (verde). As RGC foram quantificadas por contagens em fotomicrografias obtidas por microscopia confocal. As contagens foram transformadas em densidades de núcleos (células) e os resultados apresentados na forma de médias e erros padrão da média. Novamente a

transdução prévia (com antecedência de 30 dias) das RGCs produziu neuroproteção. (Petr-Silva et al, resultados inéditos)

**Exemplo 11 - Vetor *pTR-SB-smCBA-max* (Figura 2):** Em construção sobre vetor base rAAV sorotipo 2 (pTR) semelhante ao vetor base utilizado no desenho 1. Este vetor teve deletados a sequência codificante do gene de resistência bacteriana a neomicina, seu promotor eucariótico HSV-tk, o enhancer PYF441 de vírus polioma e o sinal de poliadenilação de hormônio de crescimento bovino. Estas modificações não alteram a velocidade de expressão de transgene, nem a distribuição do vetor no tecido nervoso. As modificações tornam o vetor capaz de uso em ensaios clínicos em humanos.

**Exemplo 12 - Vetor *pHpa-trs-SK-max* (Figura 3):** Em construção sobre vetor base scAAV sorotipo 2 (pHpa), distinto dos vetores base acima. O vetor base pHpa foi modificado pelo grupo do Dr. William Hauswirth, da Universidade da Florida, de forma a acelerar a expressão do transgene pela formação de um vetor dupla fita, pulando a etapa de síntese da fita complementar que é relativamente lenta. Nesse caso, o promotor é CMV (*citomegalovirus*). Este tipo de vetor expressa o transgene em até 7 dias, isto é, reduzindo em 50% o tempo necessário para expressão do transgene. Testes realizados em nosso laboratório confirmaram a aceleração da expressão do transgene GFP pelo vetor transduzido no tecido da retina.

## **Listagem de Seqüências**

**Dados do requerente:**

- (a) Nome: Universidade Federal do Rio de Janeiro
- (b) Endereço: UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pedro Calmon, 550 – Prédio da Reitoria - Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ

**Título da Invenção:** VETORES BIOLÓGICOS COMPREENDENDO O GENE MAX, MÉTODO DE PRODUÇÃO DOS MESMOS, MÉTODO DE EXPRESSÃO DO GENE MAX NAS CÉLULAS E MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA CITOPROTETORA.

**Número de seqüências constantes do pedido:** 5

**Seq. nº 1**

Tamanho: 2068 pares de bases

Tipo: cDNA

Nome do gene: MYC associated factor X (MAX), transcrito variante 1

Função: Oncoproteína

```

ggtggttctt gcccggtgtg tgtgtgtgtg tgagtgagag agcgagtgag tgagtgagtg 60
agtgtgtgtg tgggggggac tcggcttgtt gttgtcggtg acttccccct ccccttcacc 120
ccttccccct cccgccgccg ctgcagtggc cgctccctgg gccgtaggaa atg agc      176
                                     Met-Ser-
                                     1  2

gat aac gat gac atc gag gtg gag agc gac gaa gag caa ccg agg ttt      224
Asp-Asn-Asp-Asp-Ile-Glu-Val-Glu-Ser-Asp-Glu-Glu-Gln-Pro-Arg-Phe-
 3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

caa tct gcg gct gac aaa cgg gct cat cat aat gca ctg gaa cga aaa      272
Gln-Ser-Ala-Ala-Asp-Lys-Arg-Ala-His-His-Asn-Ala-Leu-Glu-Arg-Lys-
19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34

cgt agg gac cac atc aaa gac agc ttt cac agt ttg cgg gac tca gtc      320
Arg-Arg-Asp-His-Ile-Lys-Asp-Ser-Phe-His-Ser-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-
35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

cca tca ctc caa gga gag aag gca tcc cgg gcc caa atc cta gac aaa      368
Pro-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Lys-Ala-Ser-Arg-Ala-Gln-Ile-Leu-Asp-Lys-
51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66

gcc aca gaa tat atc cag tat atg cga agg aaa aac cac aca cac cag      416
Ala-Thr-Glu-Tyr-Ile-Gln-Tyr-Met-Arg-Arg-Lys-Asn-His-Thr-His-Gln-
67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82

caa gat att gac gac ctc aag cgg cag aat gct ctt ctg gag cag caa      464
Gln-Asp-Ile-Asp-Asp-Leu-Lys-Arg-Gln-Asn-Ala-Leu-Leu-Glu-Gln-Gln-
83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98

gtc cgt gca ctg gag aag gcg agg tca agt gcc caa ctg cag acc aac      512
Val-Arg-Ala-Leu-Glu-Lys-Ala-Arg-Ser-Ser-Ala-Gln-Leu-Gln-Thr-Asn-
99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114

tac ccc tcc tca gac aac agc ctc tac acc aac gcc aag ggc agc acc      560
Tyr-Pro-Ser-Ser-Asp-Asn-Ser-Leu-Tyr-Thr-Asn-Ala-Lys-Gly-Ser-Thr-
115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130

atc tct gcc ttc gat ggg ggc tcg gac tcc agc tcg gag tct gag cct      608
Ile-Ser-Ala-Phe-Asp-Gly-Gly-Ser-Asp-Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Glu-Pro-
131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146

```

gaa gag ccc caa agc agg aag aag ctc cgg atg gag gcc agc taa 653  
 Glu-Glu-Pro-Gln-Ser-Arg-Lys-Lys-Leu-Arg-Met-Glu-Ala-Ser-Stop  
 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161

gccactcggg gcaggccagc aataaaaact gtctgtctcc atcgtctcat cctcctttca 713  
 gttcgttggt agagccctca gaaccattta agagactett tatttttctc tttctccctt 773  
 ttttttttaa atttttattt ttacgtagaa gctcttgagc aacagctctc gttctccttc 833  
 cccatttcca ctgtatatatt tttaatgtat tccttcagg gattccctgt ccccaacagg 893  
 aattttttaa ccaaaacacc ccaacttggc agctttttct gtggaggaca gacggccggc 953  
 cggacctctg agcacatagt gtctgccc cctaccagc tcctccagcc ctgccgggca 1013  
 catgcccggg ggacgcctgc cctgcccagg tggcctcctg gccgcctc acctctgata 1073  
 gactttgtga atctgaactg ctctactttg agaagatgac cggtttggag taatcagaat 1133  
 gaaccctcct cctttttaag ggtttttttt ttttctttt tctaaaagc tatgtatcgc 1193  
 tcctattgaa agaccagatc cttagagaag tttgtggtat aaaaaggaag tggggacaga 1253  
 ttcgcagcac agagtcgctg gcatgtttca ctctgcttc tctcagccag ctgtttaagc 1313  
 ctgcccggcc agcctcacgg agggccgtgt gacactctcg tggatgtat gggagatggc 1373  
 agcagtgaag cagcagccac cagggagtgg ccatttgggg ttgggacagg gaggggtgtt 1433  
 tgggtggcat agaggttttg tattgagggc cagtgatgat gttttgatat ttatttctctg 1493  
 ctacttaa attgaaatctga gtgaattgta cctatttctg atgatgctcg tcttgcaaag 1553  
 cgacagattc ataaagtaat gatgaaatct ttctttcttc ccgtgtgtat ttctaagaaa 1613  
 tagagccaac tgattttgta tgtaaatacc aagagcaatt tacctggtac taaaccgca 1673  
 ccccagtgcg gacccttccc agcctcatc ccacttctt tcctactgtc ctggaacctg 1733  
 tctccattgt gtgatccagc cctggttctg gctgtggtca gcagatgcca gtgaagggtt 1793  
 ttgtgtgttt aggccctcatt tctttgtctt tttctactc cgttctctggc atttctctgat 1853  
 ttctagtgta tactctgtag tctcagttcg tgtttgattc cattccatgg aaataaaaag 1913  
 tatgttgtag atactgccga agaattgtct tgcaagttaa ggcttcccc tttactataa 1973  
 gactataaat aaaaacttat tttatcctta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2033  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2068

**Seq. nº 2**

Tamanho: 456 pares de bases

Tipo: cDNA

Nome do gene: MAX21

Função: Oncoproteína

```

atg agc gat aac gat gac atc gag gtg gag agc gac gct gac aaa cgg      48
Met-Ser-Asp-Asn-Asp-Asp-Ile-Glu-Val-Glu-Ser-Asp-Ala-Asp-Lys-Arg-
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16

gct cat cat aat gca ctg gaa cga aaa cgt agg gac cac atc aaa gac      96
Ala-His-His-Asn-Ala-Leu-Glu-Arg-Lys-Arg-Arg-Asp-His-Ile-Lys-Asp-
17  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32

agc ttt cac agt ttg cgg gac tca gtc cca tca ctc caa gga gag aag     144
Ser-Phe-His-Ser-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Pro-Ser-Lys-Gln-Gly-Glu-Lys-
33  34  35  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48

gca tcc cgg gcc caa atc cta gac aaa gcc aca gaa tat atc cag tat     192
Ala-Ser-Arg-Ala-Gln-Ile-Leu-Asp-Lys-Ala-Thr-Glu-Tyr-Ile-Gln-Tyr-
49  50  51  52  53  54  55  56  57  58  59  60  61  62  63  64

atg cga agg aaa aac cac aca cac cag caa gat att gac gac ctc aag     240
Met-Arg-Arg-Lys-Asn-His-Thr-His-Gln-Gln-Asp-Ile-Asp-Asp-Leu-Lys-
65  66  67  68  69  70  71  72  73  74  75  76  77  78  79  80

cgg cag aat gct ctt ctg gag cag caa gtc cgt gca ctg gag aag gcg     288
Arg-Gln-Asn-Ala-Leu-Leu-Glu-Gln-Gln-Val-Arg-Ala-Leu-Glu-Lys-Ala-
81  82  83  84  85  86  87  88  89  90  91  92  93  94  95  96

agg tca agt gcc caa ctg cag acc aac tac ccc tcc tca gac aac agc     336
Arg-Ser-Ser-Ala-Gln-Leu-Gln-Thr-Asn-Tyr-Pro-Ser-Ser-Asp-Asn-Ser-
97  98  99  100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112

ctc tac acc aac gcc aag ggc agc acc atc tct gcc ttc gat ggg ggc     384
Leu-Tyr-Thr-Asn-Ala-Lys-Gly-Ser-Thr-Ile-Ser-Ala-Phe-Asp-Gly-Gly-
113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128

tcg gac tcc agc tcg gag tct gag cct gaa gag ccc caa agc agg aag     432
Ser-Asp-Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Glu-Pro-Glu-Glu-Pro-Gln-Ser-Arg-Lys-
129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144

aag ctc cgg atg gag gcc agc taa                                     456
Lys-Leu-Arg-Met-Glu-Ala-Ser-Stop
145 146 147 148 149 150 151 152

```



**Seq. nº 4**

Tamanho: 472 pares de bases

Tipo: Vetor de clonagem + cDNA do MAX21 + Vetor de clonagem

Nome do gene: NotI-MAX21-NotI

Função: Oncoproteína

```

gcgggccgc atg agc gat aac gat gac atc gag gtg gag agc gac gct gac      50
      Met-Ser-Asp-Asn-Asp-Asp-Ile-Glu-Val-Glu-Ser-Asp-Ala-Asp-
        1  2  3  4  5  6  7  8  9 10 11 12 13 14

aaa cgg gct cat cat aat gca ctg gaa cga aaa cgt agg gac cac atc      98
Lys-Arg-Ala-His-His-Asn-Ala-Leu-Glu-Arg-Lys-Arg-Arg-Asp-His-Ile-
15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

aaa gac agc ttt cac agt ttg cgg gac tca gtc cca tca ctc caa gga     146
Lys-Asp-Ser-Phe-His-Ser-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Pro-Ser-Lys-Gln-Gly-
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46

gag aag gca tcc cgg gcc caa atc cta gac aaa gcc aca gaa tat atc     194
Glu-Lys-Ala-Ser-Arg-Ala-Gln-Ile-Leu-Asp-Lys-Ala-Thr-Glu-Tyr-Ile-
47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62

cag tat atg cga agg aaa aac cac aca cac cag caa gat att gac gac     242
Gln-Tyr-Met-Arg-Arg-Lys-Asn-His-Thr-His-Gln-Gln-Asp-Ile-Asp-Asp-
63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78

ctc aag cgg cag aat gct ctt ctg gag cag caa gtc cgt gca ctg gag     290
Leu-Lys-Arg-Gln-Asn-Ala-Leu-Leu-Glu-Gln-Gln-Val-Arg-Ala-Leu-Glu-
79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94

aag gcg agg tca agt gcc caa ctg cag acc aac tac ccc tcc tca gac     338
Lys-Ala-Arg-Ser-Ser-Ala-Gln-Leu-Gln-Thr-Asn-Tyr-Pro-Ser-Ser-Asp-
95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110

aac agc ctc tac acc aac gcc aag ggc agc acc atc tct gcc ttc gat     386
Asn-Ser-Leu-Tyr-Thr-Asn-Ala-Lys-Gly-Ser-Thr-Ile-Ser-Ala-Phe-Asp-
111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126

ggg ggc tcg gac tcc agc tcg gag tct gag cct gaa gag ccc caa agc     434
Gly-Gly-Ser-Asp-Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Glu-Pro-Glu-Glu-Pro-Gln-Ser-
127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142

agg aag aag ctc cgg atg gag gcc agc taa cgccggcg                       472
Arg-Lys-Lys-Leu-Arg-Met-Glu-Ala-Ser-Stop
143 144 145 146 147 148 149 150 151 152

```



### Reivindicações

#### VETORES BIOLÓGICOS COMPREENDENDO O GENE MAX, MÉTODO DE PRODUÇÃO DOS MESMOS, MÉTODO DE EXPRESSÃO DO GENE MAX NAS CÉLULAS E MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA CITOPROTETORA.

5

1. Vetor biológico caracterizado por compreender o gene *max* e por compreender:

a) um vetor de clonagem compreendendo:

a.1) uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene *max* ou seus fragmentos;

10

a.2) um promotor adequado;

b) vetores de transporte, escolhidos do grupo que compreende vetores de transporte virais, vetores de transporte não-virais e mistura dos mesmos.

2. Vetor biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo vetor de clonagem de a) compreender vetores do grupo de plasmídeos, vírus, cosmídeos e/ou YACs.

15

3. Vetor biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela sequencia nucleotídica ser escolhida do grupo que compreende as Seq ID 1, 2, 3, 4, 5 e mistura das mesmas.

20

4. Vetor biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo promotor ser escolhido do grupo que compreende promotores CBA, CMV e/ou CBA/CMV.

25

5. Vetor biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos vetores de transporte não-viral serem escolhidos do grupo que compreende plasmídeos, lipossomos, compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica como DNA-fosfato de cálcio, DNA-DEAE dextran, DNA-lípide, DNA-proteína, DNA-lípide-proteína, HACs (cromossomos artificiais), nanopartículas, microinjeção, eletroporação, injeção de plasmídeo, injeção balística de DNA e mistura dos mesmos.

6. Vetor biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelos vetores de transporte viral serem escolhidos do grupo que compreende adenovírus, vírus adeno-associados, vírus adeno-associados recombinantes, retrovírus, vírus da herpes, lentivirus, HIV, vaccinia e mistura dos mesmos.

5 7. Método de produção de vetores biológicos compreendendo o gene *max* caracterizado por compreender as etapas de:

a) prover um vetor de clonagem compreendendo:

a.1) uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene *max* ou seus fragmentos;

10 a.2) um promotor adequado;

b) prover um vetor biológico escolhido dentre vetores de transporte virais, vetores de transporte não-virais e mistura dos mesmos;

c) contactar o vetor biológico de b) e o vetor de clonagem de a).

15 8. Método de produção de vetores biológicos, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo vetor de clonagem de a) compreender vetores do grupo de plasmídeos, vírus, cosmídeos e/ou YACs.

9. Método de produção de vetores biológicos, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela sequencia nucleotídica ser escolhida do grupo que compreende as Seq ID 1, 2, 3, 4, 5 e mistura das mesmas.

20 10. Método de produção de vetores biológicos, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo promotor ser escolhido do grupo que compreende promotores CBA, CMV e/ou CBA/CMV e/ou, alternativamente, promotores específicos para determinados tipos de células alvo como, por exemplo, neurônios.

25 11. Método de produção de vetores biológicos, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelos vetores de transporte não-viral serem escolhidos do grupo que compreende plasmídeos, lipossomos, compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica como DNA-fosfato de cálcio, DNA-DEAE dextran, DNA-lípide, DNA-proteína, DNA-lípide-proteína,  
30 HACs (cromossomos artificiais), nanopartículas, microinjeção, eletroporação, injeção de plasmídeo, injeção balística de DNA e mistura dos mesmos.

12. Método de produção de vetores biológicos, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelos vetores de transporte viral serem escolhidos do grupo que compreende adenovírus, vírus adeno-associados, vírus adeno-associados recombinantes, retrovírus, vírus da herpes, lentivirus, HIV, vaccinia e mistura dos mesmos.

13. Método de expressão do gene *max* em células caracterizado por compreender a etapa de contactar o vetor biológico com uma célula-alvo adequada, onde o vetor biológico compreende:

a) um vetor de clonagem compreendendo:

a.1) uma seqüência nucleotídica capaz de expressar o gene *max* ou seus fragmentos;

a.2) um promotor adequado;

b) vetores de transporte, escolhidos do grupo que compreende vetores de transporte virais, vetores de transporte não-virais e mistura dos mesmos.

14. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela célula-alvo ser qualquer célula de um animal superior.

15. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo animal superior ser o homem.

16. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pela célula-alvo ser um neurônio.

17. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo vetor de clonagem de a) compreender vetores do grupo de plasmídeos, vírus, cosmídeos e/ou YACs.

18. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pela sequencia nucleotídica ser escolhida do grupo que compreende as Seq ID 1, 2, 3, 4, 5 e mistura das mesmas.

19. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo promotor ser escolhido do grupo que compreende promotores CBA, CMV e/ou CBA/CMV e/ou, alternativamente, promotores específicos para determinados tipos de células alvo como, por exemplo, neurônios.

20. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelos vetores de transporte não-viral serem escolhidos do grupo que compreende plasmídeos, lipossomos, compostos catiônicos de origem lipídica, protéica e amidoprotéica como DNA-fosfato de cálcio, DNA-DEAE dextran, DNA-lípide, DNA-proteína, DNA-lípide-proteína, HACs (cromossomos artificiais), nanopartículas, microinjeção, eletroporação, injeção de plasmídeo, injeção balística de DNA e mistura dos mesmos.

21. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelos vetores de transporte viral serem escolhidos do grupo que compreende adenovírus, vírus adeno-associados, vírus adeno-associados recombinantes, retrovírus, vírus da herpes, lentivirus, HIV, vaccinia e mistura dos mesmos.

22. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo vetor biológico estar associado a um veículo farmacologicamente aceitável.

23. Método de expressão, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo veículo farmacologicamente aceitável ser escolhido do grupo que compreende excipientes e carreadores farmacologicamente aceitáveis, doses e tratamentos convenientes para uso em composições particulares que podem ser descritas em uma série de regimentos de tratamento, incluindo oral, parenteral, intravenoso, intranasal, intramuscular, intracerebral, intracerebroventricular e intraocular.

24. Método de terapia gênica caracterizado por compreender a etapa de introdução de um vetor biológico contendo o gene *max* em pelo menos uma célula-alvo de um animal superior para modular a atividade celular da célula-alvo.

25. Método de terapia gênica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo animal superior ser o homem.

26. Método de terapia gênica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pela célula-alvo ser um neurônio.

27. Método de terapia gênica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pela modulação da atividade da célula-alvo ter preferencialmente função citoprotetora.

5 28. Método de terapia gênica, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pela modulação da atividade da célula-alvo ter preferencialmente função neuroprotetora.

**Figuras**

FIGURA 1

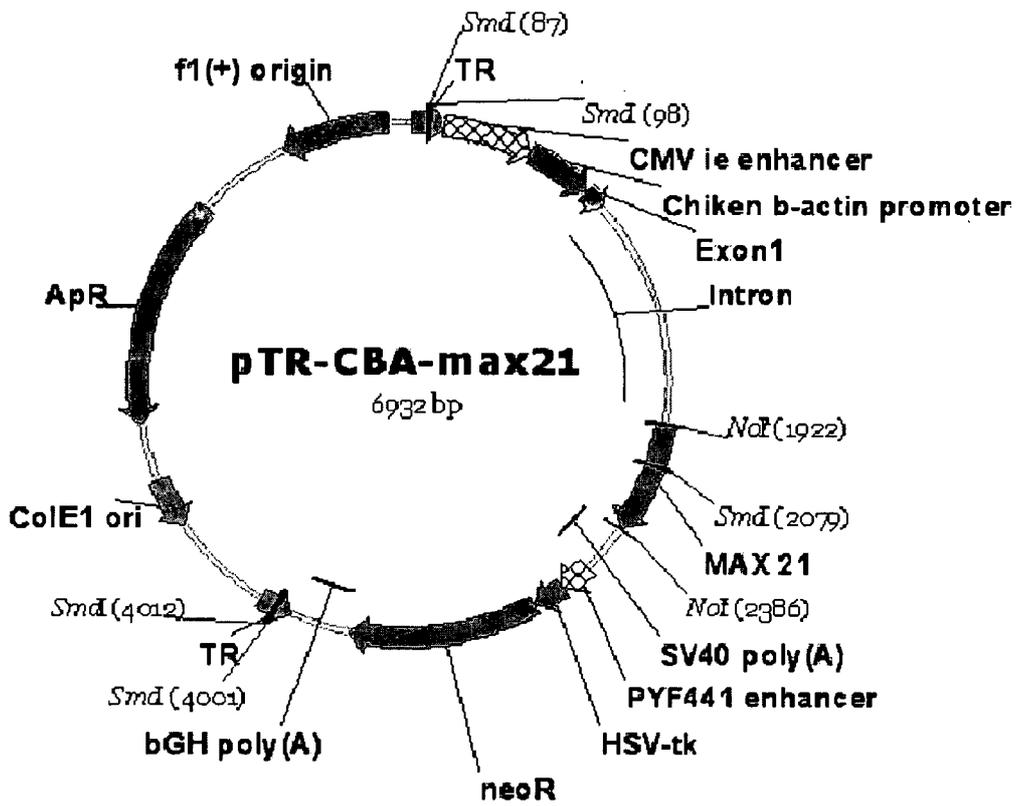


FIGURA 2

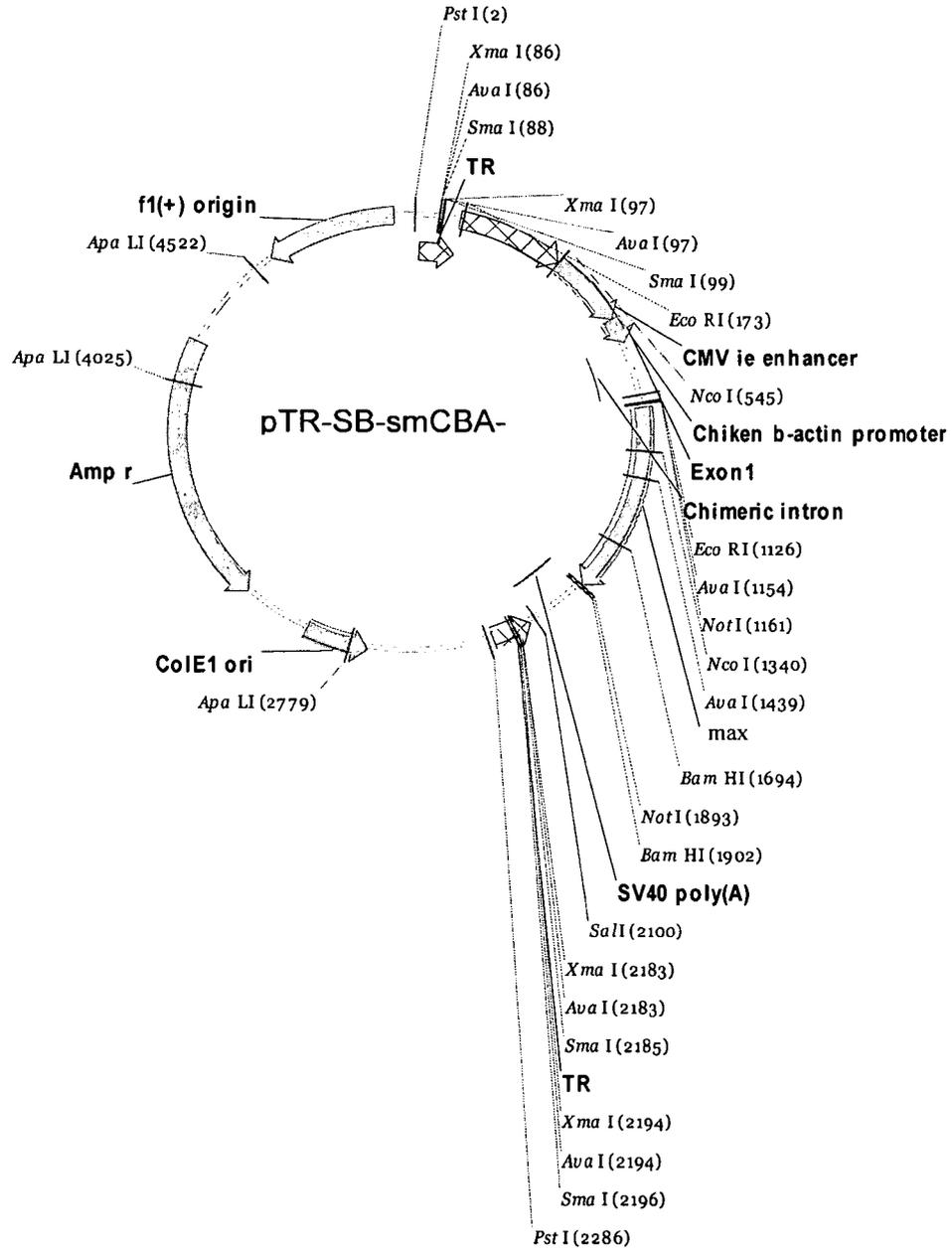


FIGURA 3

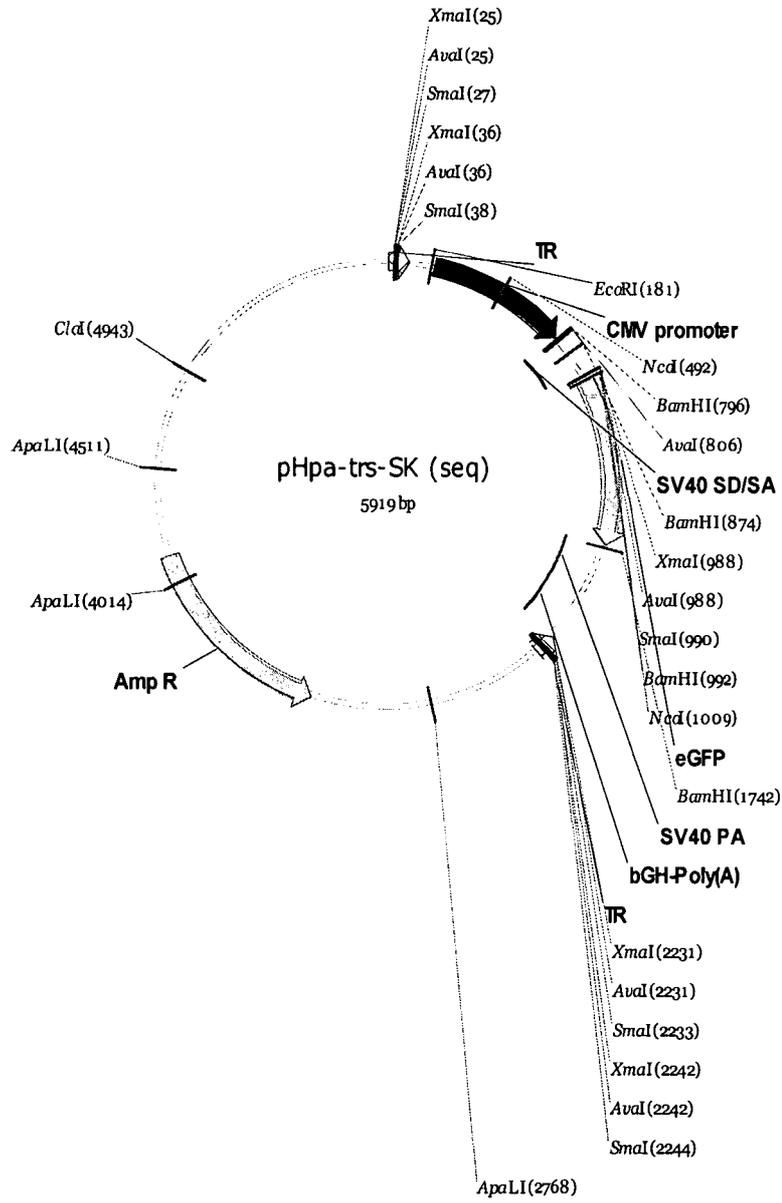


FIGURA 4

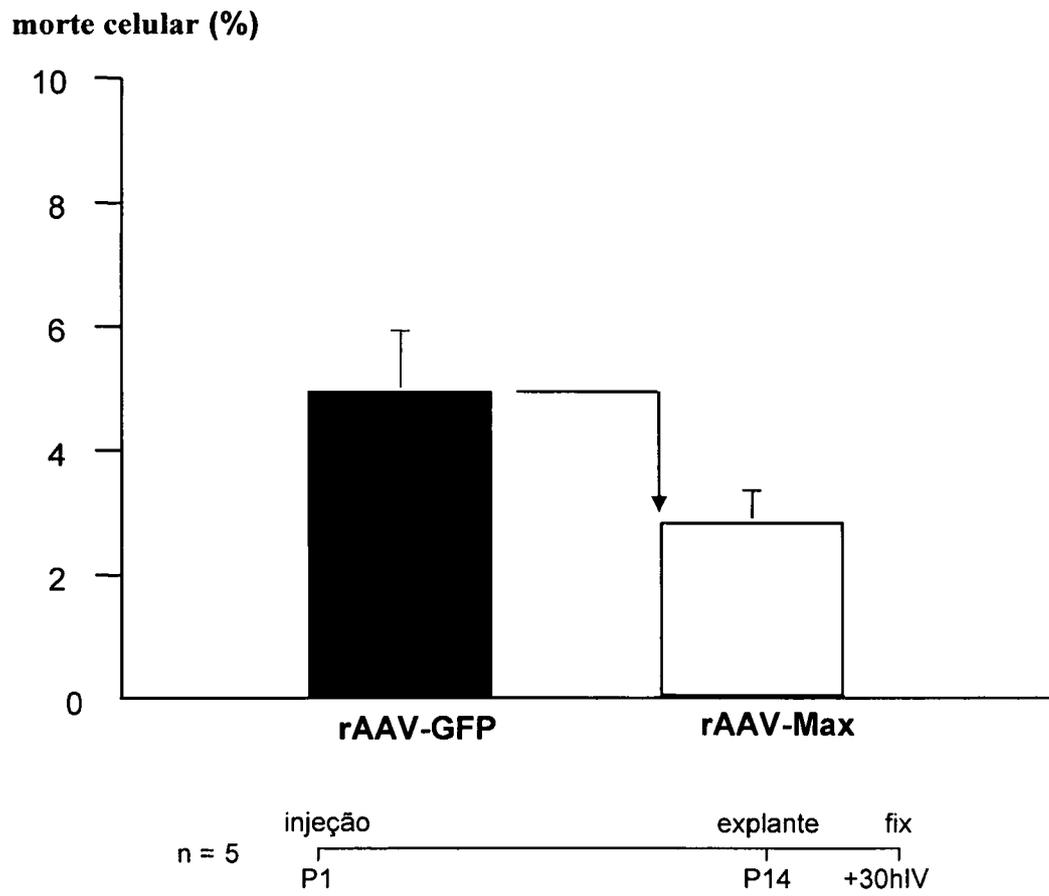


FIGURA 5

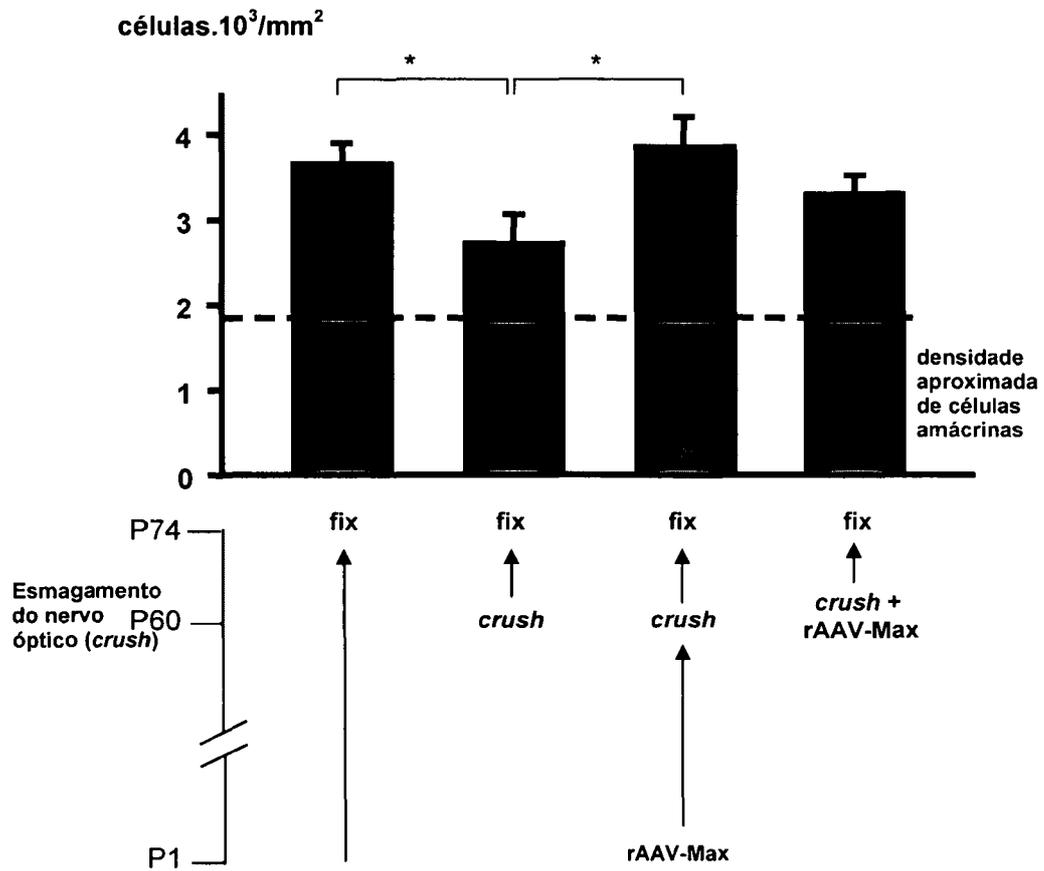
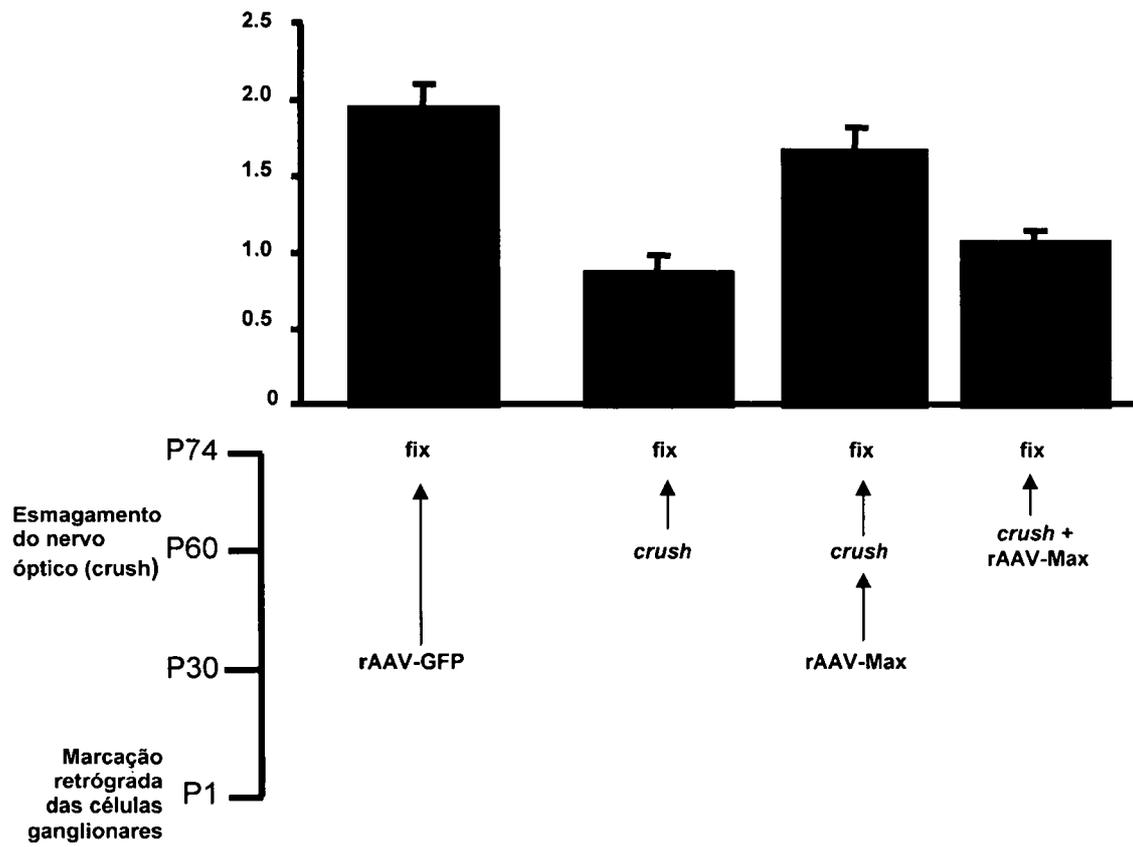


FIGURA 6



**Resumo**

VETORES BIOLÓGICOS COMPREENDENDO O GENE MAX, MÉTODO DE PRODUÇÃO DOS MESMOS, MÉTODO DE EXPRESSÃO DO GENE MAX NAS CÉLULAS E MÉTODO DE TERAPIA GÊNICA CITOPROTETORA.

A presente invenção está relacionada a construções de vetores de clonagem contendo o gene *max*. Especialmente, a presente invenção trata da introdução dos vetores de clonagem contendo o gene *max* nas células utilizando vetores de transporte. Adicionalmente, a presença de vetores de clonagem contendo o gene *max* nas células permite a expressão diferencial do gene *max* nas mesmas células. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a um método de terapia gênica no qual a expressão diferencial do gene *max* possui atividade citoprotetora, especialmente neuroprotetora, podendo ser aplicada a terapêutica médica e veterinária para condições de neurodegeneração.