



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação*: PT 811074 E

(51) *Classificação Internacional*: (Ed. 6)
C12N015/86 A C12N005/10 B
A61K038/17 B

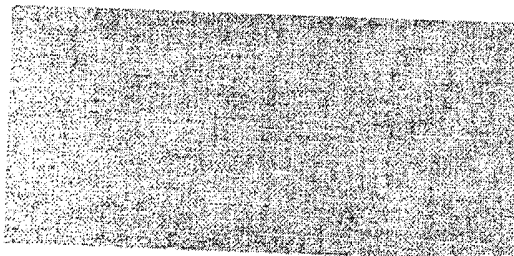
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito</i>: 1996.02.23</p> <p>(30) <i>Prioridade</i>: 1995.02.24 US 393734</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido</i>: 1997.12.10</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão</i>: 2001.02.07</p>	<p>(73) <i>Titular(es)</i>: THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA CENTER TEC.TRANSFER, 3700 MARKET STR, SUITE 300 PHILAD.PENNSYLVANIA 19104-3147 US</p> <p>(72) <i>Inventor(es)</i>: JAMES M. WILSON US KAREN KOZARSKY US JEROME STRAUSS, III US</p> <p>(74) <i>Mandatário(s)</i>: PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT</p>
--	---

(54) *Epígrafe*: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE TERAPIA GÉNICA PARA O TRATAMENTO DE DEFEITOS NO METABOLISMO LIPOPROTEICO

(57) *Resumo*:

MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE TERAPIA GÉNICA PARA O TRATAMENTO DE DEFEITOS NO METABOLISMO LIPOPROTEICO





DESCRIÇÃO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES DE TERAPIA GÉNICA PARA O TRATAMENTO DE DEFEITOS NO METABOLISMO LIPOPROTEICO"

Esta invenção foi financiada pelo National Institute of Health Grant N° DK 42193-05 e HD 29946. O governo dos Estados Unidos possui direitos nesta invenção.

Campo da invenção

A presente invenção refere-se ao campo da terapia génica somática e tratamento de desordens genéticas relacionadas com o metabolismo lipoproteico.

Antecedentes da Invenção

O metabolismo de lípidos, particularmente colesterol, envolve a interacção de um número de lipoproteínas e apolipoproteínas. Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e apolipoproteína E (apoE) são moléculas precursoras chave na produção de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e no metabolismo geral de lípidos, incluindo colesterol. LDL é a lipoproteína principal de transporte de colesterol no plasma humano.

Os receptores de VLDL/apoE são expressos no coração, músculo esquelético, e tecido adiposo [F.M. Wittmaack et al., *Endocrinol.*, **136**(1): 340-348 (1995)] com baixos níveis de expressão no rim, placenta, pâncreas, e cérebro. Foi sugerido que este receptor desempenha um papel na incorporação de partículas de lipoproteínas ricas em triglicéridos por órgãos específicos. O ADNc codificante para o receptor de VLDL humano putativo foi recentemente clonado [M.E. Gafvels et al., *Som. Cell Mol. Genet.*, **19**: 557-569 (1993), aqui incorporado por

referência. O receptor para LDL está localizado em depressões revestidas na superfície das células no fígado e outros órgãos.

Como apresentado na Fig. 1A, num humano normal saudável, as moléculas de apolipoproteína B48 (Apo-B48), apolipoproteína C-II (Apo-C-II) e Apo E formam uma partícula quilomicron no plasma passando através dos intestinos, que interaccua com um receptor de quilomicron que permanece no fígado. Após metabolismo dos quilomicron tomados pelo receptor que permanece, o fígado produz a lipoproteína primária, VLDL, que contém Apo-E, Apo-C-II e apolipoproteína B100 (Apo B100). VLDL é metabolizada em LDL, que se liga ao receptor de LDL no fígado através de Apo B100. O receptor de LDL no fígado facilita a incorporação de LDL por endocitose mediada por receptor. LDL é degradada em lisossomas, e o seu colesterol é libertado para utilização metabólica.

Defeitos no metabolismo de tais lipoproteínas e/ou receptores resultam em várias desordens metabólicas. A doença humana familiar hipercolesterolemia (FH) é causada em primeiro lugar por uma ou mais mutações no gene que codifica o receptor de LDL. FH é caracterizada clinicamente por (1) uma elevada concentração de LDL; (2) deposição de colesterol derivado de LDL em tendões e pele (xantomas) e em artérias (ateromas); e (3) herança como uma característica autossómica dominante com um efeito de dosagem de gene. Indivíduos com FH desenvolvem doença coronária do coração prematura, normalmente na infância. Os heterozigóticos contabilizam cerca de 1 em 500 pessoas, colocando FH entre os erros congénitos mais comuns de metabolismo. Os heterozigóticos possuem subidas de duas vezes no colesterol do plasma (350 a 550 mg/dL) a partir do nascimento e tendem a desenvolver xantoma do tendão e aterosclerose coronária após os 20 anos de idade. Os homozigóticos constituem 1 pessoa num milhão e são caracterizados por hipercolesterolemia severa (650 a 1000 mg/dL), xantoma cutânea que surge durante os primeiros 4 anos de vida e doença coronária do coração que se inicia na infância e frequentemente provoca a morte antes dos 20



anos de idade. [J. Goldstein et al, "Familial Hypercholesterolemia", Capítulo 48, em *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6ª ed., C. R. Scriver et al (eds), McGraw-Hill Information Services Co., NY, NY, (1989) pp. 1215-1250].

Outra desordem metabólica é a hiperlipidemia familiar combinada (FCH) que foi primeiro associada com a hiperlipidemia em sobreviventes de enfarte do miocárdio e seus familiares. Os doentes de FCH geralmente possuem um de três fenótipos: (1) níveis elevados de *VLDL*, (2) níveis elevados de *LDL*, ou (3) aumentos nos níveis de ambas as lipoproteínas no plasma. Ao contrário da FH, a FCH surge em apenas 10 a 20 por cento dos doentes na infância, normalmente sob a forma de hipertrigliceridemia. A homozigotia para a característica pode resultar em hipertrigliceridemia severa. [J. Goldstein et al, "Disorders of the Biogenesis and Secretion of Lipoproteins", Capítulo 44B em *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6ª ed., C. R. Scriver et al (eds), McGraw-Hill Information Services Co., NY, NY, (1989) pp. 1155-1156]. Esta desordem também está associada com o aparecimento de intolerância a glucose e obesidade num número de indivíduos.

A anormalidade mais surpreendente da FCH é a subida acentuada do conteúdo em *VLDL* no plasma. A produção aumentada de *VLDL* leva a um teor expandido de *VLDL* no plasma em alguns indivíduos, mas noutros com lipólise mais eficiente resulta em níveis aumentados de *LDL*. A FCH caracteriza-se por uma produção excessiva de *LDL*, mais do que por um defeito genético no receptor de *LDL*. Os receptores de *LDL* de fibroblastos em cultura parecem ser normais em doentes com FCH.

A experiência clínica sugere que a FCH seja pelo menos cinco vezes tão predominante como a FH, ocorrendo em cerca de 1 por cento da população norte americana. A predilecção em relação a doença de artéria coronária entre os doentes com esta desordem torna-a na causa metabólica conhecida mais proeminente de aterosclerose prematura [J. Goldstein et al, citado acima].



Quando os receptores de *LDL* são deficientes como em FH (ver Fig. 1B), ou é produzido *LDL* em excesso devido a excesso de *VLDL* como em FCH, a remoção eficaz de *LDL* do plasma pelo fígado diminui e o nível de *LDL* aumenta na proporção inversa do número de receptores. O excesso de *LDL* no plasma é depositado em tecidos conjuntivos e em células de manutenção, resultando nos sintomas de qualquer das desordens.

Presentemente, o tratamento para FH e FCH é dirigido para a diminuição do nível de *LDL* no plasma através da administração de fármacos, i.e., administração combinada de uma resina de ligação a ácido biliar e um inibidor de redutase de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA para o tratamento de FH e niacina para o tratamento de FCH. Contudo, homozigóticos de FH com dois genes não funcionais são resistentes a fármacos que actuam através da estimulação de receptores de *LDL*. De modo semelhante, tais fármacos não são particularmente eficazes em FCH. Em homozigóticos de FH os níveis de *LDL* no plasma podem ser reduzidos apenas através de meios físicos ou cirúrgicos.

A administração de genes receptores de *LDL* normais através de terapia génica utilizando um vector de adenovírus tem sido contemplada para o tratamento de FH. Os vectores de adenovírus são capazes de proporcionar níveis extremamente elevados de distribuição transgénica a virtualmente todos os tipos de células, independentemente do estado mitótico. A eficácia deste sistema na distribuição de um transgene terapêutico *in vivo* que complementa um desequilíbrio genético foi demonstrada em modelos animais de várias desordens [K. F. Kozarsky *et al*, *Somatic Cell Mol. Genet.*, **19**:449-458 (1993) ("Kozarsky I"); K. F. Kozarsky *et al*, *J. Biol. Chem.*, **269**:13695-13702 (1994) ("Kozarsky II"); Y. Watanabe, *Atherosclerosis*, **36**:261-268 (1986); K. Tanzawa *et al*, *FEBS Letters*, **118**(1):81-84 (1980); J.L. Golasten *et al* *New Engl. J. Med.*, **309**:288-296 (1983); S. Ishibashi *et al*, *J. Clin. Invest.*, **92**:883-893 (1993); e S. Ishibashi *et al*, *J. Clin. Invest.*, **93**:1885-1893 (1994)]. A utilização de vectores de



adenovírus na transdução de genes para hapatócitos *in vivo* foi anteriormente demonstrada em roedores e coelhos [ver, p. ex., Kozarsky II, citado acima, e S. Ishibashi *et al*, *J. Clin. Invest.*, **92**:883-893 (1993)].

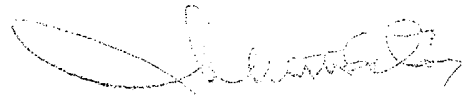
Estudos recentes demonstraram que a introdução de um adenovírus recombinante codificando para o ADNc do receptor de LDL humano ("LDLR") nos fígados de coelhos deficientes no receptor de LDL Watanabe hiperlipidémicos hereditários (WHHL), que mimetizam a condição de FH, resultando em grandes reduções transientes no colesterol do plasma. A natureza transiente do efeito de adenovírus recombinantes na maioria das situações é atribuída ao desenvolvimento das respostas imunitárias celulares às células infectadas com vírus e à sua subsequente eliminação. Os alvos antigénicos para remoção mediada por processo imunitário são proteínas virais expressas a partir do genoma viral recombinante e/ou o produto do transgene, que neste caso é a proteína receptora de LDL [Y. Yang *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**:4407-4411 (Maio de 1994); Y. Yang *et al*, *Immun.*, **1**:433-442 (Agosto de 1994)].

Adicionalmente, reinfusões repetidas do adenovírus contendo o gene de LDLR não produziram reduções de colesterol semelhantes subsequentes, devido ao desenvolvimento de anticorpos anti-adenovírus neutralizantes [Kozarsky I e Kozarsky II, citados acima; ver também Y. Yang *et al*, *Immun.*, **1**:433-442 (Agosto de 1994), todos aqui incorporados por referência].

Subsiste a necessidade na técnica para composições terapêuticas e estratégias de terapia génica que permitam o tratamento eficaz e/ou a prevenção de FH e de FCH, bem como outros defeitos no metabolismo das lipoproteínas.

Sumário da Invenção

Num aspecto, a invenção proporciona um vector viral recombinante compreendendo um gene do receptor de VLDL humano



("VLDLR") ligado operacionalmente a sequências reguladoras, dirigindo a sua expressão num hepatócito.

Noutro aspecto, a invenção proporciona um hepatócito de mamífero que expressa um gene de VLDLR humano nele introduzido através de transdução por um vector viral de acordo com a invenção.

Ainda noutro aspecto, a invenção proporciona um método para distribuição *in vitro* e integração estável de um gene de VLDLR numa célula de hepatócito de mamífero compreendendo introduzir na referida célula uma quantidade eficaz de um vector viral recombinante de acordo com a invenção.

A invenção também inclui uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e um vector de acordo com a invenção e a utilização de um tal vector no fabrico de um medicamento.

Através da utilização desta invenção, um doente possuindo uma desordem metabólica pode ser tratado administrando ao doente, através de uma via apropriada, uma quantidade eficaz de um vector de acordo com a invenção, de modo a que o referido gene de VLDLR seja integrado no cromossoma dos referidos hepatócitos do doente e o referido receptor seja expresso de forma estável *in vivo* numa localização no corpo em que não seja normalmente expresso.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção são descritos em mais pormenor na seguinte descrição detalhada das realizações preferidas desta.

Breve Descrição das Figuras

A Fig. 1A é um desenho esquemático do metabolismo de lipoproteínas de coelho e de humano normais. As apolipoproteínas são referidas como B48, B100, C-II e E. LDL e VLDL estão identificadas.

A Fig. 1B é um desenho esquemático do metabolismo de lipoproteínas em doentes com FH e coelhos WHHL. As abreviaturas são como descritas na Fig. 1A.

A Fig. 1C é um desenho esquemático do metabolismo de lipoproteínas em coelhos sujeitos a infusão com o gene de *VLDLR* recombinante de acordo com a invenção.


A Fig. 2 é um desenho esquemático do plasmídeo pAd. CMVVLDLR, que contém as unidades de mapa de adenovírus 0-1 (Ad 0-1) seguidas por um intensificador/promotor de citomegalovírus (CMV enh/prom), um gene de *VLDLR* humano, um sinal de poliadenilação (pA), unidades de mapa de adenovírus 9-16 (Ad 9-16) e sequências de plasmídeo do plasmídeo pAT153 incluindo uma origem de replicação e gene de resistência a ampicilina. As enzimas endonucleases de restrição são representadas por designações convencionais na construção do plasmídeo.

A Fig. 3 é um mapa esquemático do adenovírus recombinante H5.010CMVVLDLR, no qual 0-100 representam as unidades de mapa de um adenovírus de tipo 5 (No. de Acesso ao GenBank M73260) e a minicassete CMV/*VLDLR*/pA de pAd. O CMVVLDLR é inserido entre as unidades de mapa de adenovírus 1 e 9, com as restantes unidades de mapa de Ad5 9-100 possuindo uma deleção no gene E3 parcial entre cerca da unidade de mapa 78,5 e cerca de 84,3.

A Fig. 4A é uma representação gráfica apresentando as alterações nos níveis de colesterol do plasma em mg/dL para coelhos WHHL como uma função dos dias antes e após receber o adenovírus recombinante H5.010CMVlacZ. Os símbolos representam animais individuais. Ver Exemplo 3.

A Fig. 4B é uma representação gráfica apresentando as alterações nos níveis de colesterol do plasma em mg/dL para coelhos WHHL como uma função dos dias antes e após receber o adenovírus recombinante H5.010CMVVLDLR. Os símbolos representam a resposta de quatro animais individuais. Ver Exemplo 3.

A Fig. 5 é um gráfico de barras representando os níveis de colesterol (medidos como % pré-infusão) em murganhos sujeitos a



infusão com adenovírus recombinante H5.010CMVlacZ(lacZ), adenovírus recombinante H5.010CMVVLDLR e adenovírus recombinante H5.010CBhLDLR. As barras a ponteados representam níveis de pré-infusão e as barras a cheio representam níveis pós-infusão. Ver Exemplo 4.

A Fig. 6 é um gráfico de barras representando níveis de colesterol, especificamente os níveis das fracções de lipoproteínas de plasma (medidos como mg/fracção) em murganhos sujeitos a infusão com adenovírus recombinante H5.010CMVlacZ (lacZ), adenovírus recombinante H5.010CMVVLDLR e adenovírus recombinante H5.010CBhLDLR. As barras a cheio representam proteínas ou fragmentos que possuem uma densidade (d) > 1,21; as barras com linhas oblíquas ascendentes representam HDL; as barras com ponteados intensos representam LDL, as barras com linhas oblíquas descendentes representam lipoproteína de densidade intermédia (IDL), e as barras a branco representam níveis de VLDL. Ver Exemplo 4.

A Fig. 7A é uma representação gráfica apresentando as alterações nos níveis de colesterol (medidos em mg/dL) como uma função de dias pré- e pós-infusão para murganhos com receptor de LDL removido, sujeitos a infusão com H5.010CMVlacZ. Os símbolos representam as respostas de animais individuais. Ver Exemplo 5.

A Fig. 7B é uma representação gráfica apresentando as alterações nos níveis de colesterol (medidos em mg/dL) como uma função de dias pré- e pós-infusão para murganhos com receptor de LDL removido, sujeitos a infusão com H5.010CBhLDLR. Os símbolos são os mesmos que para a Fig. 7A. Ver Exemplo 5.

A Fig. 7C é uma representação gráfica apresentando as alterações nos níveis de colesterol (medidos em mg/dL) vs. dias pré- e pós-infusão para murganhos com receptor de LDL removido, sujeitos a infusão com H5.010CMVVLDLR. Os símbolos são os mesmos do que para a Fig. 7A. Ver Exemplo 5.

A Fig. 7D é uma representação gráfica apresentando os resultados médios \pm desvio padrão das duas experiências para

murganhos com receptor de *LDL* removido, sujeitos a infusão com H5.010CMVLacZ (n=9) ou com H5.010CMVVLDLR (n=10). Os níveis de colesterol médios pré-infusão foram de 870 mg/dL e 946 mg/dL, respectivamente. Os asteriscos indicam $p < 0,05$.

As Figs. 8A-8F são a sequência de ADN [SEQ ID NO:1] com a sequência de aminoácidos codificada [SEQ ID NO:2] do gene do receptor de *VLDL* humano, como relatado por Gafvels *et al*, citado acima.

As Figs. 9A-9I são a sequência de ADN de pAd.CMVVLDLR [SEQ ID NO:3], na qual Ad 0-1 vai dos nucleótidos 12-364, CMV ehn/prom representa os nucleótidos 381-862; os nucleótidos 966-4107 codificam para *VLDLR*, pA representa os nucleótidos 4192-4390; Ad 9.2-16.1 representa os nucleótidos 4417-6880 e os nucleótidos 6881-9592 são sequências de pAT153.

A Fig. 10A é um gráfico de barras ilustrando a actividade de CTL (média \pm desvio padrão) medida como uma razão efector:célula alvo de 25:1.** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$.

A Fig. 10B é um gráfico de linhas ilustrando a actividade de CTL medida contra razões variadas de efector:alvo.

A Fig. 11A é um gráfico sumarizando o título de anticorpos neutralizantes presente em amostras de BAL de murganhos C57BL/6 infectados com adenovírus no dia 0 e necrotizados no dia 28 como descrito no Exemplo 9. O controlo representa murganhos normais ("controlo"); CD4 mAB representa murganhos empobrecidos em células CD4⁺; IL-12 representa murganhos tratados com IL-12 e IFN- γ representa murganhos tratados com IFN- γ .

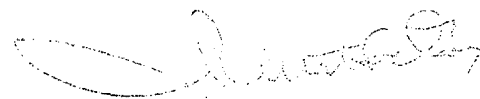
A Fig. 11B é um gráfico sumarizando as quantidades relativas (DO₄₀₅) de IgG presente em amostras de BAL. Os símbolos são como descritos na Fig. 11A.

A Fig. 11C é um gráfico sumarizando as quantidades relativas (DO₄₀₅) de IgA presente em amostras de BAL. Os símbolos são como descritos na Fig. 11A.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção proporciona novos métodos e composições que permitem o tratamento terapêutico de desordens metabólicas, tais como FH e FCH, caracterizadas pela acumulação de LDL em plasma humano. Esta invenção proporciona a utilização de um vector viral para introduzir e expressar de forma estável um gene normalmente expresso em mamíferos, i.e., o gene que codifica um receptor normal para lipoproteína de muito baixa densidade (VLDLR) numa localização no corpo onde esse gene não está naturalmente presente, i.e., no fígado.

Os métodos e composições da presente invenção ultrapassam os problemas previamente identificados no tratamento de terapia génica de indivíduos deficientes no receptor de LDL. Como descrito em detalhe abaixo, através da utilização de um vector viral capaz de ter como alvo células do fígado, o gene do receptor de VLDL é introduzido e expresso com estabilidade em células do fígado. A presente invenção difere da substituição directa do gene no sentido em que a proteína do receptor de VLDL é normalmente expressa em indivíduos deficientes em receptor de LDL, p. ex. os macrófagos. Assim, a terapia génica utilizando um vector viral dirigido ao fígado contendo um gene de VLDL não resultaria na expressão de um novo produto de gene, mas antes na expressão *de novo* num órgão que de outra forma não expressa o produto do gene. Um aspecto importante é que o doente não produz uma resposta imunitária contra o produto do gene de VLDL expresso no fígado, porque o gene de VLDL distribuído pelo vector não é reconhecido como um antigénio estranho e não existe indução de eliminação da célula transfectada mediada por CTL. Em contraste, a eliminação de vectores virais mediada por CTL é um problema quando é administrado um gene de LDLR a um indivíduo deficiente em LDLR com FH [ver, p. ex., Kozarsky I e II, citados acima].



Devido a este reconhecimento do gene de *VLDLR* pelo sistema imunitário do doente como um gene conhecido, e da tendência dos hepatócitos para possuir um longo tempo de vida em circulação, os hepatócitos transfectados com o vector desta invenção que expressam o gene de *VLDLR* tendem a ser estáveis e a expressão de *VLDLR* não é transiente. A expressão do gene de *VLDLR* em hepatócitos transfectados ocorre durante a duração do tempo de vida dos hepatócitos. A desordem metabólica de lipoproteínas pode ser tratada durante períodos mais longos sem a necessidade de reinjeção do vector viral, limitando assim o número de exposições virais e reacções imunitárias potenciais contra proteínas virais codificadas no vector.

Os vectores e métodos desta invenção podem proporcionar terapia génica útil para o tratamento e/ou suplemento de tratamentos correntes para desordens metabólicas de lipoproteína. A presença do gene do receptor de *VLDL* nos hepatócitos transfectados de acordo com esta invenção permite a ligação de *VLDL*, um precursor de *LDL*, do plasma no sítio do fígado, diminuindo assim a quantidade de *VLDL* no plasma. A diminuição de *VLDL* no plasma diminui consequentemente a produção de *LDL* do plasma.

Por exemplo, em FH, esta redução no *LDL* do plasma pode compensar os receptores de *LDL* deficientes no fígado. Em FCH, esta produção reduzida de *LDL* do plasma a partir de *VLDL* impede que os receptores de *LDL* normais no fígado se tornem sobrecarregados pelo excesso de *LDL*, e reduz o excesso de *VLDL* que contribui para a desordem. Compare-se, por exemplo, as representações esquemáticas na operação normal do metabolismo lipídico (Fig. 1A) com o metabolismo anormal provocado por FH (Fig. 1B) e depois com o método desta invenção (Fig. 1C).

I. Partículas Virais Recombinantes como Vectores de Terapia Génica




As composições desta invenção envolvem a construção de vectores de terapia génica desejáveis, que são capazes de distribuir e integrar de forma estável um gene de receptor de *VLDL* funcional, normal para hepatócitos. Tais vectores de terapia génica incluem um vector de vírus seleccionado, desejavelmente com remoção de um ou mais genes virais, um minigene contendo o gene de *VLDL* sob o controlo de sequências de regulação, e vírus de auxílio opcionais e/ou linhas celulares recombinantes que fornecem aos vectores virais quaisquer produtos necessários de genes virais removidos.

As sequências virais utilizadas nos vectores, vírus de auxílio, se necessário, e partículas virais recombinantes, e outros componentes do vector e sequências empregues na construção dos vectores aqui descritos são obtidos a partir de fontes comerciais ou académicas baseadas em sequências anteriormente publicadas e descritas. Estes materiais virais podem também ser obtidos de um doente individual. As sequências virais e os componentes de vector podem ser gerados seguindo as técnicas e referências aqui contidas, acopladas com técnicas de clonagem molecular recombinante convencionais conhecidas e praticadas pelos especialistas na técnica. Podem ser criadas modificações de sequências de ácido nucleico existentes formando os vectores, incluindo deleções, inserções e outras mutações de sequência relatadas nesta especificação, utilizando técnicas convencionais.

Os métodos empregues para a selecção de sequências virais úteis num vector, a clonagem e construção do "minigene" de *VLDLR* e a sua inserção num vector viral desejável e a produção de uma partícula viral infecciosa recombinante através da utilização de vírus auxiliares e afins estão na especialidade da técnica dadas as descrições aqui fornecidas.

A. Construção do "Minigene"




Por "minigene" entende-se a combinação do gene de *VLDLR* e dos outros elementos de regulação necessários para transcrever o gene e expressar o produto do gene *in vivo*. A sequência do receptor de *VLDL* humana foi fornecida [ver Gafvels *et al*, citado acima; SEQ ID NOS: 1 e 2]. Geralmente, a região codificante total desta sequência do receptor é utilizada no minigene; as sequências 5' e 3' não traduzidas de SEQ ID NO: 1 não são essenciais para o minigene. Os genes de receptor de *VLDL* com origem noutros mamíferos, p. ex., coelho, macaco, etc., também podem ser úteis nesta invenção.

O gene receptor de *VLDL* (*VLDLR*) está operacionalmente ligado a componentes de regulação de um modo que permite a sua transcrição. Tais componentes incluem elementos de regulação convencionais necessários para dirigir a expressão do transgene *VLDLR* numa célula transfectada com o vector viral. Assim, o minigene contém também um promotor seleccionado que está ligado ao transgene e localizado, com outros elementos reguladores, nas sequências virais seleccionadas do vector recombinante.

A selecção do promotor é um assunto de rotina e não é uma limitação desta invenção. Promotores úteis podem ser promotores constitutivos ou promotores regulados (indutíveis), que possibilitem o controlo da quantidade do transgene a ser expressa. Por exemplo, um promotor desejável é o promotor/estimulador precoce imediato do citomegalovírus [ver, por exemplo, Boshart *et al.*, *Cell*, **41**: 521-530 (1985)]. Outro promotor desejável inclui o promotor/estimulador LTR do vírus do sarcoma de Rous. Ainda outra sequência de promotor/estimulador é o promotor da β -actina citoplásmica de galinha [T.A. Kost *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, **11**(23):8287 (1983)]. Outros promotores adequados podem ser seleccionados por especialistas da técnica.

O minigene pode também desejavelmente conter sequências de ácido nucleico heterólogas das sequências do vector viral incluindo sequências que fornecem sinais necessários para a poliadenilação eficiente do transcrito (poli-A ou pA) e intrões




com sítios de separação funcionais dadores e receptores. Uma sequência poli-A comum que é empregue nos vectores exemplificativos desta invenção é o derivado do papovavírus SV-40. A sequência poli-A é geralmente inserida no minigene a seguir às sequências do transgene e antes das sequências do vector viral. Uma sequência comum de intrão é também derivada de SV-40, e é referida como sequência T do intrão SV-40. Um minigene da presente invenção pode também conter tal intrão, desejavelmente localizado entre a sequência do promotor/estimulador e o transgene. A selecção deste e de outros elementos comuns a vectores são convencionais [ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual.", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nova Iorque (1989) e referências nele citadas] e muitas destas sequências estão disponíveis de fontes comerciais e industriais assim como no Genbank.

Como acima mencionado, o minigene está localizado no sítio de qualquer deleção seleccionada no vector viral. Ver Exemplo 1 abaixo.

B. Construção do Vector Plasmídico Viral

Embora um número de vectores virais tenham sido sugeridos para terapia génica, o vector mais desejável para este fim é um vector recombinante adenoviral ou vector adeno-associado. Os vectores de adenovírus como descrito abaixo são preferidos porque podem ser purificados em grandes quantidades e altamente concentrados, e o vírus pode fazer a transdução de genes em células que não estão em divisão. Contudo, está dentro da especialidade da técnica para outros adenovírus, ou mesmo retrovírus, vaccinia ou outros vectores de vírus a ser construídos de modo semelhante.


Os adenovírus são vírus de ADN de eucariotas que podem ser modificados para distribuir eficientemente um transgene repórter



ou terapêutico numa variedade de tipos de células. Os adenovírus humanos compreendem um genoma de ADN linear de dupla cadeia de aproximadamente 36 Kpb, que está dividido em 100 unidades de mapa (m.u.), cada uma das quais com 360 pb de comprimento. O ADN contém repetições terminais invertidas curtas (ITR) em cada extremidade do genoma que são necessárias para a replicação viral. Os produtos dos genes estão organizados em regiões precoces (E1 a E4) e tardias (L1 a L5), com base na expressão antes ou depois da iniciação da síntese de ADN viral [ver, por exemplo, Horwitz, *Virology*, 2ª ed., ed. B.N. Fields, Raven Press, Ltd., Nova Iorque (1990)]. Os adenovírus gerais de tipo 2 e 5 (Ad2 e Ad5, respectivamente), não estão associados a doenças humanas.

Os vectores de adenovírus adequados úteis em terapia génica são bem conhecidos [ver, por exemplo, M.S. Horwitz et al., "Adenoviridae and Their Replication", *Virology*, segunda edição, pg. 1712, ed. B.N. Fields et al., Raven Press Ltd., Nova Iorque (1990); M. Rosenfeld et al., *Cell*, **68**:143-155 (1992); J. F. Engelhardt et al., *Human Genet. Ther.*, **4**:759-769 (1993); Y. Yang et al., *Nature Genet.*, **7**:362-269 (1994); J. Wilson, *Nature*, **365**:691-692 (Out. 1993); B.J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed. P. Tijsser, CRC Press, pp. 155-168 (1990). A selecção do tipo de adenovírus não é antecipada para limitar a seguinte invenção.

Os vectores de adenovírus úteis nesta invenção podem incluir as sequências de ADN de um número de tipos de adenovírus. As sequências de adenovírus úteis nos vectores aqui descritos podem ser obtidas a partir de qualquer tipo de adenovírus conhecido, incluindo os 41 tipos humanos presentemente identificados [ver, p. ex., Horwitz, citado acima]. A sequência de uma estirpe de adenovírus tipo 5 pode ser prontamente obtida a partir do Acesso da Genbank No. M73260. De modo semelhante, os adenovírus conhecidos por infectar outros animais podem também ser empregues nas construções de vectores



desta invenção. Uma variedade de estirpes de adenovírus estão disponíveis a partir da American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, ou disponíveis sob pedido a partir de uma variedade de fontes comerciais e institucionais.


Os vectores de adenovírus úteis nesta invenção incluem adenovírus recombinantes, deficientes, contendo opcionalmente outras mutações, p. ex., mutações sensíveis à temperatura, deleções e vectores híbridos formados com sequências de adenovírus/vírus adeno-associados. Os vectores adequados estão descritos na literatura publicada [ver, por exemplo, Kozarsky I e II, citados acima, e as referências aqui citadas, Patente U.S. No. 5 240 846 e os pedidos co-pendentes aqui incorporados por referência abaixo.

Vectores de adenovírus úteis para a distribuição do gene de *VLDLR* no fígado, sequências de ácido nucleico de adenovírus mínimas podem ser utilizadas para obter um vector, sendo nesse caso necessária a utilização de um vírus auxiliar para produzir uma partícula de vírus híbrida. Alternativamente, apenas podem ser empregues deleções seleccionadas de um ou mais genes de adenovírus para construir um vector viral. Os produtos dos genes interrompidos podem ser fornecidos utilizando uma linha celular de empacotamento seleccionada, que fornece o produto do gene em falta.

1. Adenovírus Recombinante Mínimo

Os vectores de adenovírus (Ad) desejáveis úteis na presente invenção estão descritos em detalhe no Pedido de Patente U.S. co-pendente de co-propriedade com o No. de Série 08/331 381, que é aqui incorporado por referência com a finalidade de descrever estes vectores.

Num sumário breve, o vírus Ad mínimo é uma partícula viral contendo apenas os elementos cis do adenovírus necessários para a replicação e encapsidação do virião, mas por outro lado



removido de todos os vírus do adenovírus. Isto é, o vector contém apenas as sequências de um adenovírus da repetição terminal invertida (ITR) em 5' e 3' com actividade cis (que funcionam como origens de replicação) e o domínio nativo 5' empacotamento/estimulador, que contém sequências necessárias para empacotar genomas de Ad lineares e elementos estimuladores para o promotor E1. Esta sequência terminal (5') esquerda do genoma de Ad5 representa as pb de 1 a cerca de 360 do genoma convencional de adenovírus Ad5 publicado, também referido como as unidades de mapa 0-1 do genoma viral, e geralmente tem desde cerca de 353 até cerca de 360 nucleótidos em comprimento. Esta sequência inclui o 5' ITR (pb 1 até cerca de 103 do genoma do adenovírus); e o domínio empacotamento/estimulador (pb de cerca de 194 até cerca de 358 do genoma de adenovírus). As sequências de adenovírus 3' mínimas do vector de adenovírus podem incluir o terminal direito sequência ITR(3') do genoma adenoviral representando cerca de 35 353 pb para o final do genoma de adenovírus, ou unidades de mapa ~98,4-100. Esta sequência é geralmente de cerca de 580 nucleótidos de comprimento. Entre estas sequências, é inserido um minigene de *VLDLR*, como acima descrito.

A produção de uma partícula infecciosa deste vector viral Ad mínimo envolve a assistência de um vírus auxiliar, como discutido abaixo. Um segundo tipo de vector mínimo também revelado na referência acima incorporada coloca a sequência terminal 5' de Ad num arranjo cabeça-para-cauda relativo à sequência do terminal 3'. O vector Ad mínimo co-infectado com um vírus auxiliar e/ou uma linha celular de empacotamento fornece todos os produtos de gene viral necessários para produzir uma partícula viral recombinante infectante contendo o minigene de *VLDLR*. Alternativamente, este vector pode conter sequências de genes de adenovírus adicionais, que não são então requeridos para serem fornecidos por um vírus auxiliar.



2. Outros Adenovírus Deficientes


Adenovírus recombinantes deficientes na replicação úteis para terapia génica desta invenção podem ser caracterizados por conterem mais do que as sequências de adenovírus mínimas definidas acima. Estes outros vectores Ad podem ser caracterizadas por deleções ou várias porções de regiões de genes do vírus, e partículas de vírus infecciosas formadas pela utilização opcional de vírus auxiliares e/ou linhas celulares de empacotamento. Os adenovírus deficientes adequados são descritos em maior detalhe em Kozarsky e Wilson, *Curr. Opin. Genet. Devel.*, **3**:499-503 (1993); Kozarsky I e II, citados acima, e referências aqui citadas, todos aqui incorporados por referência.

Como um exemplo, os vectores adequados podem ser formados por deleção do todo ou de uma porção suficiente do gene Ela precoce imediato adenoviral precoce (que se estende de mu 1,3 a 4,5) e do gene Elb precoce tardio (que se estende de mu 4,6 a 11,2), de modo a eliminar as suas funções biológicas normais. Estes vírus desprovidos de El de replicação deficiente são capazes de se replicarem e produzirem vírus infecciosos quando cultivados numa linha celular de complementação de rim embrionário humano transformada com adenovírus, a célula 293 [ATCC CRL 1573], contendo os genes de adenovírus Ela e Elb funcionais, que fornecem os produtos genéticos correspondentes em trans. O vírus resultante é capaz de infectar muitos tipos de células e pode expressar um transgene (i.e., o gene de *VLDLR*), mas não se consegue replicar na maioria das células que não contêm o ADN da região El a menos que a célula seja infectada a uma multiplicidade de infecção muito elevada. A experiência vasta em animais indica que os vectores desprovidos de El não são particularmente desejáveis para terapia génica porque são expressos baixos níveis de proteínas virais que produzem respostas imunitárias celulares destrutivas.

Como um exemplo preferido, o todo ou uma porção do gene precoce tardio de adenovírus E3 (que se estende de mu 76,6 a 86,2) pode ser eliminado da sequência de adenovírus que forma uma parte da construção híbrida. A função de E3 é irrelevante para a função e produção da partícula de vírus recombinante. Por exemplo, os vectores Ad podem ser construídos com um minigene terapêutico inserido na região E1 removida da parte estrutural do conhecido mutante Ad5 sub360 [J. Logan *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:3655-3659 (1984)]; ou a parte estrutural do mutante Ad5 d17001 [Dr. William Wold, Washington University, St. Louis]. Ambos os vírus mutantes contêm também uma deleção na região E3 do genoma adenoviral; em sub360, de 78,5 a 84 mu e em d17001, de 78,4 a 86 mu. O ciclo de vida de sub360 e d17001 apresenta características selvagens.

Os vectores de adenovírus mais preferidos podem ser construídos possuindo uma deleção do gene E1, pelo menos uma porção da região E3, e uma deleção adicional em genes de adenovírus que não E1 e E3 para acomodar o minigene VLDLR e/ou outras mutações que resultem em expressão reduzida de proteína adenoviral e/ou reduzida replicação adenoviral. Por exemplo, o todo ou parte do gene precoce E2a tardio do adenovírus (que se estende de mu 67,9 a 61,5) pode ser eliminado do vector de adenovírus. É também antecipado que porções dos outros genes precoces tardios E2b (que se estende de mu 29 a 14,2) e E4 (que se estende de mu 96,8 a 91,3) podem também ser eliminados do vector de adenovírus.

As deleções podem também ser feitas em qualquer dos genes tardios L1 até L5, que se estendem de mu 16,45 até 99 do genoma de adenovírus. Do mesmo modo, as deleções podem ser úteis nos genes intermediários IX (que se situam entre mu 9,8 e 11,2) e IVa₂ (que se situa entre 16,1 e 11,1). Outras deleções úteis podem também ser realizadas nos outros genes de adenovírus estruturais ou não estruturais.



Uma sequência de adenovírus para utilização na presente invenção pode conter apenas deleções de E1. Alternativamente, deleções de genes inteiros ou porções eficazes na destruição da sua actividade biológica podem ser utilizadas em qualquer combinação. Por exemplo, num vector exemplificativo, a sequência de adenovírus pode conter deleções dos genes E1 e do gene E3, ou dos genes E1, E2a e E3, ou dos genes E1 e E4, ou dos genes E1, E2a e E4, com ou sem deleção de E3, e outras.

Os vectores podem também conter mutações adicionais em genes necessários para a replicação viral. Os vectores de adenovírus podem conter uma mutação que produz vírus sensíveis à temperatura (ts). Entre essas mutações inclui-se a incorporação da mutação de alteração de sentido sensível à temperatura na região E2a encontrada na estirpe Ad5 H5ts 125 [P. Vander Vliet *et al.*, *J. Virol.*, **15**:348-354 (1975)] a 62,5 mu. Uma única substituição de aminoácido (62,5 mu) na extremidade carboxílica da proteína de 72 kd (DBP) produzida a partir do gene E2a nesta estirpe produz uma proteína produto que é uma proteína de ligação ao ADN de cadeia simples e está envolvida na replicação do ADN genómico viral. A temperaturas permissivas (aproximadamente 32°C) a estirpe ts é capaz de um crescimento com um ciclo de vida completo em células HeLa, enquanto que a temperaturas não permissivas (aproximadamente 38°C), não é observada replicação do ADN viral. Adicionalmente, a temperaturas não permissivas, é observada a diminuição da proteína de 72 kd imunorreactiva em células HeLa.

Vectores exemplificativos para utilização nesta invenção, por exemplo, podem ser obtidos pela combinação de fragmentos de três construções de ADN independentes, incluindo sub360 ou d17001, H5ts 125, e um plasmídeo de ADNc com sequências Ela colocadas 5' em relação a um minigene terapêutico. Este tipo de vector é descrito, por exemplo, por J.F. Engelhardt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**:6196-6200 (Junho 1994); Y. Yang *et al.*, *Nature Genet.* **7**:362-369 (Julho 1994) e referências nolo



citadas, todas as referências aqui incorporadas por referência. Devido às mutações no vector, verifica-se replicação viral reduzida, redução na proteína expressa e um aumento na persistência da expressão do transgene. Outros vectores de adenovírus preferidos contêm a mutação H5ts 125 em adição às deleções E3 de sub360 e d17001. O minigene contendo *VLDLR* como o transgene pode ser inserido em qualquer região removida do vírus Ad seleccionado.

Um vírus exemplificativo utilizado para demonstrar esta invenção é o vector de adenovírus deficiente H5.010CMV*VLDLR*, que contém sequências de adenovírus Ad m.u. 0-1, seguido por um minigene *VLDLR*, e a sequência Ad m.u. 9 a 100 com pequenas deleções em E3. Ver Fig. 3, abaixo descrita. O adenovírus recombinante foi inteiramente removido de E1a, E1b e parcialmente removido de E3. Este vector de vírus recombinante é descrito em detalhe no Exemplo 1.

3. Vectores Híbridos Ad/AAV


Outro vector preferido é um vector híbrido Ad/AAV, que é objecto do Pedido de Patente co-pendente, em co-propriedade Ser. No. 08/331 384, que é aqui incorporado por referência.

Num mínimo, as sequências de ácidos nucleicos de adenovírus empregues no vector híbrido desta invenção são as sequências genómicas de adenovírus mínimas necessárias para empacotar ADN genómico adenoviral numa cabeça de cápsula pré-formada, como descrito acima. A sequência 5' completa de adenovírus contendo o 5' ITR e a região de empacotamento/estimulador pode ser empregue como a sequência 5' de adenovírus no vector híbrido. As sequências de adenovírus 3' do vector incluem a sequência (3') ITR do terminal direito do genoma adenoviral discutida acima. Algumas modificações destas sequências que não afectam adversamente a sua função biológica podem ser aceitáveis.

Também são parte dos vectores híbridos desta invenção as sequências de um vírus adeno-associado. As sequências de AAV úteis no vector híbrido são as sequências virais das quais as sequências codificando o polipéptido *rep* e *cap* são removidas. Mais especificamente, as sequências de AAV empregues são as repetições terminais invertidas 5' e 3' de actuação *cis* [Ver, p. ex., B. J. Carter, citado acima]. As sequências ITR de AAV têm cerca de 143 pb de comprimento. As sequências completas que codificam as ITRs são substancialmente utilizadas em vectores, embora se espere ser permissível para esta utilização algum grau de modificações menores destas sequências. A capacidade para modificar estas sequências ITR está dentro da especialidade da técnica. Ver, p. ex., Sambrook et al, citado acima.

Na construção do vector híbrido Ad/AAV, as sequências de AAV são flanqueadas pelas sequências de adenovírus discutidas acima. As sequências ITR de AAV 5' e 3' flanqueiam elas próprias uma sequência de minigene de *VLDLR* como descrito acima. Assim, a sequência formada pelo minigene *VLDLR* e sequências flanqueadoras de AAV 5' e 3' podem ser inseridas em qualquer sítio de deleção nas sequências de adenovírus do vector. Por exemplo, as sequências de AAV são inseridas desejavelmente no sítio dos genes *E1a/E1b* removidos do adenovírus, i.e., após a unidade de mapa 1. Em alternativa, as sequências de AAV podem ser inseridas numa deleção de *E3*, deleção *E2a*, e assim por diante. Se apenas forem utilizadas no vector as sequências de adenovírus 5' ITR/empacotamento e sequências 3' ITR, as sequências de AAV são inseridas entre elas.

Como descrito acima para as sequências de adenovírus mínimas, essas sequências genéticas não presentes na porção de adenovírus do vector híbrido devem ser fornecidas através de uma linha celular de empacotamento e/ou um adenovírus de auxílio para criar a partícula viral híbrida recombinante. A tomada deste vírus híbrido pela células é provocada pela capacidade de infecção que contribuiu para o vector, através das sequências de



adenovírus e de AAV. Uma vez que o vírus ou conjugado de vírus seja tomado pela célula, o transgene flanqueado pela ITR de AAV deve ser resgatado da estrutura do adenovírus mãe. O resgate do transgene está dependente do fornecimento da célula infectada com um gene *rep* de AAV.

O gene *rep* de AAV pode ser fornecido ao vírus híbrido através de vários métodos descritos no pedido acima incorporado. Uma realização para proporcionar proteínas *rep* em *trans* é transfectando para a monocamada alvo de células previamente infectadas com o vector híbrido, um plasmídeo envolvido em liposoma contendo os genes que codificam para as proteínas *rep* de AAV de 78 kDa e 52 kDa sob o controlo do promotor P5 de AAV. Mais preferencialmente para utilização *in vivo*, o gene *rep* de AAV também pode ser distribuído como parte de um vírus híbrido. Uma realização deste conceito de partícula única é fornecido por um conjugado de polimerização do vírus híbrido. A infecção deste conjugado de vírus modificado é realizada do mesmo modo que em relação às mesmas células alvo como indicado acima. Contudo, o conjugado de polimerização do vírus híbrido no qual foi directamente complexado um plasmídeo que codificava as proteínas *rep* 78 e 52, combina todas as componentes funcionais numa estrutura de partícula única. Assim, o conjugado de vírus híbrido permite a distribuição de uma partícula única para a célula, que é consideravelmente mais desejável para utilização terapêutica. Noutra realização, o vírus híbrido é modificado através da clonagem do ADNc de *rep* directamente para a porção do genoma do adenovírus do vector híbrido.

Estes e aspectos adicionais deste vector híbrido são fornecidos pelo pedido acima incorporado por referência.

C. Produção da Partícula Viral Recombinante

1. Vírus Auxiliares/Linhas Celulares de Empacotamento

Dependendo do conteúdo em genes de adenovírus dos vectores plasmídicos empregues para transportar o minigene *VLDLR*, podem ser necessários uma linha celular de empacotamento ou um adenovírus auxiliar ou ambos para proporcionar sequências genéticas de adenovírus suficientes necessárias para produzir uma partícula viral recombinante infecciosa contendo o minigene *VLDLR*.

Os vírus auxiliares úteis contêm sequências genéticas de adenovírus seleccionadas que não estão presentes na construção do vector de adenovírus ou são expressas pela linha celular na qual o vector é transfectado. Um vírus auxiliar preferido é desejavelmente deficiente para a replicação e contém uma variedade de genes de adenovírus em adição às sequências modificadas descritas acima. Neste cenário, o vírus auxiliar é desejavelmente utilizado em combinação com uma linha celular de empacotamento que expressa de forma estável genes de adenovírus. Os vírus auxiliares podem também formar-se em conjugados polimerização como descrito em Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **264**: 16985-16987 (1989); K. J. Fisher e J. M. Wilson, *Biochem. J.*, **299**: 49 (1 de Abril, 1994), e no Pedido de Patente U.S. com o No. Série 08/331 381, aqui incorporado por referência.

O vírus auxiliar pode opcionalmente conter um segundo minigene repórter. É conhecido na técnica um número de tais genes repórteres. A presença de um gene repórter no vírus auxiliar que é diferente do transgene no vector de adenovírus permite que tanto o vector Ad como o vírus auxiliar sejam monitorizados independentemente. Este segundo repórter é utilizado para permitir a separação entre o vírus recombinante resultante e o vírus auxiliar durante a purificação. A construção das células auxiliares desejáveis está dentro da especialidade da técnica.

Como um exemplo, se a linha celular empregue para produzir o vector viral não for uma linha celular de empacotamento, e o vector contiver apenas as sequências de adenovírus mínimas

identificadas acima, o vírus auxiliar pode ser um vector Ad selvagem fornecendo os genes precoces de adenovírus necessários E1, E2a, E2b e todos os restantes genes tardios, intermediários, estruturais e não estruturais do genoma do adenovírus. Se, nesta situação, a linha celular de empacotamento é a 293, que fornece as proteínas E1, a linha celular auxiliar não necessita conter o gene E1.

Nesta realização, se a construção do vector de adenovírus é deficiente em replicação (sem gene E1 e opcionalmente sem gene E3) e for expressa a linha celular 293, não é necessário vírus auxiliar para a produção do vírus híbrido. O E3 pode ser eliminado do vírus auxiliar porque este produto de gene não é necessário para a formação de uma partícula de vírus funcionar.

Preferencialmente, para facilitar a purificação e reduzir a contaminação da partícula de vector viral com o vírus auxiliar, é útil modificar as sequências de gene adenoviral nativa do vírus auxiliar que são responsáveis pelo empacotamento eficiente, de modo a interromper substancialmente ou "tornar deficiente" a função de empacotamento do vírus auxiliar ou a sua capacidade de replicação.

Um adenovírus "tornado deficiente" desejável é modificado no seu domínio de empacotamento/estimulador 5' ITR, que normalmente contém pelo menos sete sequências distintas por enquanto funcionalmente redundantes necessárias para o empacotamento eficiente ou genomas de adenovírus lineares replicados (sequências "PAC"). Dentro de uma secção de sequência de nucleótidos dos pb 194-358 do genoma de Ad5 estão localizadas cinco destas sequências PAC: PAC I ou a sua complementar nos pb 241-248 [SEQ ID NO: 4], PAC II ou a sua complementar nos pb 262-269 [SEQ ID NO: 5], PAC III ou a sua complementar nos pb 304-311 [SEQ ID NO: 6], PAC IV ou a sua complementar nos pb 314-321 [SEQ ID NO: 7], e PAC V ou a sua complementar nos pb 339-346 [SEQ ID NO: 8].

Podem ser realizadas mutações ou deleções a uma ou a mais destas sequências PAC num vírus auxiliar de adenovírus para gerar vírus auxiliares tornados deficientes desejáveis. Modificações deste domínio podem incluir sequências 5' de adenovírus que contêm menos do que todas as cinco sequências PAC de adenovírus nativo, incluindo deleções de sequências PAC contíguas ou não contíguas. Uma modificação alternativa pode ser a substituição de uma ou mais das sequências PAC nativas por uma ou mais repetições de uma sequência de consenso contendo os nucleótidos mais frequentemente utilizados das cinco sequências PAC nativas. Alternativamente, esta região de adenovírus pode ser modificada através de mutações inseridas deliberadamente, que destruam uma ou mais das sequências PAC nativas. Um especialista na técnica pode manipular ainda mais as sequências PAC para alcançar de forma semelhante o efeito de reduzir a eficiência de empacotamento do vírus auxiliar até um nível desejado.

Deve ser referido que um especialista na técnica pode construir outros vírus auxiliares ou desenvolver outras linhas celulares de empacotamento para complementar as deleções do adenovírus na construção do vector e permitir a produção da partícula de vírus recombinante fornecida nesta informação. Por isso, a utilização ou descrição de qualquer vírus auxiliar particular ou célula de empacotamento não é limitante.

Na presença de outras linhas celulares de empacotamento que são capazes de fornecer proteínas adenovirais adicionalmente a E1, o vírus auxiliar pode de acordo com isto ver removidos os genes que codificam para estas proteínas adenovirais. Tais vírus auxiliares sujeitos a remoções adicionais também contêm desejavelmente modificações que provocam deficiências como acima descrito.

Os conjugados de vírus auxiliares poli-catión, que podem estar associados a um plasmídeo contendo outros genes adenovirais, que não estão presentes no vírus auxiliar também

podem ser úteis. Os vírus auxiliares acima descritos podem ser ainda mais modificados fazendo uso da tecnologia de conjugado adenovírus-polilisina. Ver, p. ex., Wu *et al.*, citado acima; e K. J. Fisher e J. M. Wilson, citado acima.

Utilizando esta tecnologia, um vírus auxiliar contendo preferencialmente os genes adenovirais tardios é modificado através da adição de uma sequência poli-catião distribuída em redor da cápsula do vírus auxiliar. Preferencialmente, o poli-catião é poli-lisina, que se liga em redor do vector carregado negativamente para formar uma carga positiva externa. É então construído um plasmídeo para expressar esses genes adenovirais que não estão presentes no vírus auxiliar, p. ex., os genes E1, E2 e/ou E4. O plasmídeo associa-se ao conjugado do vírus auxiliar através das cargas na sequência de poli-lisina. Este conjugado permite que os genes de adenovírus adicionais sejam removidos do vírus auxiliar e estejam presentes num plasmídeo que não se venha a incorporar no vírus durante a produção do vector viral recombinante. Assim, o impacto da contaminação é consideravelmente diminuído.

2. Montagem da Partícula Viral e Infecção de uma Linha Celular

A montagem das sequências de ADN seleccionadas do adenovírus, o AAV e os genes repórter ou genes terapêuticos e outros elementos de vector no vector híbrido e a utilização do vector híbrido para produzir uma partícula viral híbrida utilizam técnicas convencionais. Tais técnicas incluem técnicas de clonagem convencionais de ADNc tais como as descritas em textos [Sambrook *et al.*, citado acima], a utilização de sequências de oligonucleótidos sobreponíveis do adenovírus e dos genomas de AAV, a reacção da polimerase em cadeia, e qualquer método adequado que proporcione a sequência nucleotídica desejada. São empregues técnicas convencionais de transfecção e co-transfecção, p. ex., técnicas de transfecção com CaPO_4

utilizando a linha celular de complementação 293. Outros métodos convencionais empregues incluem recombinação homóloga dos genomas virais, plaqueamento de vírus em camada de agar, métodos de medição de criação de sinal, e afins.

Por exemplo, após a construção e montagem do vector plasmídico desejável contendo o minigene, o vector é infectado *in vitro* na presença de um vírus auxiliar opcional e/ou uma linha celular de empacotamento. Ocorre recombinação homóloga entre o auxiliar e o vector, o que permite que as sequências do transgene do adenovírus no vector sejam replicadas e empacotadas em cápsulas de viriões, resultando em partículas virais de vector recombinante. O método corrente para produzir tais partículas de vírus é baseado na transfecção. Resumidamente, o vírus auxiliar é utilizado para infectar células, tais como a linha celular de empacotamento humana HEK 293, que são então subsequentemente transfectadas com um vector plasmídico de adenovírus contendo um transgene *VLDLR* através de métodos convencionais. Cerca de 30 ou mais horas após transfecção as células são recolhidas, é preparado um extracto e o vector do vírus recombinante contendo o transgene *VLDLR* é purificado através de ultracentrifugação de densidade flutuante num gradiente de CsCl.

O rendimento de transdução de partículas virais depende largamente do número de células que são transfectadas com o plasmídeo, tornando desejável a utilização de um protocolo de transfecção com elevada eficiência. Um tal método envolve a utilização de um adenovírus auxiliar poli-L-lisinilado como acima descrito. Um plasmídeo contendo o minigene *VLDLR* é então complexado directamente com uma cápsula de vírus auxiliar carregada positivamente, resultando na formação de uma partícula de transfecção única contendo o vector plasmídico e as funções de auxílio do vírus auxiliar.

II. Utilização dos Vectores de Vírus Recombinante em Terapia Génica

O vector adenoviral recombinante resultante contendo o minigene *VLDLR* produzido pela cooperação do vector de adenovírus e do vírus auxiliar ou vector adenoviral e linha celular de empacotamento, como descrito acima, proporcionando assim um veículo de transferência de genes eficaz que pode distribuir o gene de *VLDLR* a um doente *in vivo* ou *ex vivo* e proporcionar a integração do gene numa célula de fígado.

Os vectores recombinantes acima descritos são administrados a humanos de um modo convencional para terapia génica e serve como uma terapia génica alternativa ou suplementar para deficiências no receptor de LDL ou outras desordens metabólicas de lipoproteínas. Pode ser administrado a um doente um vector viral contendo o gene de *VLDLR*, preferencialmente suspenso numa solução biologicamente compatível ou veículo de distribuição farmacologicamente aceitável. Um veículo adequado inclui solução salina estéril. Podem ser empregues com esta finalidade outras soluções para injeções estéreis isotónicas aquosas e não aquosas e suspensões estéreis não aquosas conhecidas como sendo veículos farmacologicamente aceitáveis e bem conhecidos dos especialistas na técnica.

Os vectores virais são administrados em quantidades suficientes para transfectar as células do fígado e proporcionar níveis de transferência e de expressão do gene de *VLDLR* suficientes para proporcionar um benefício terapêutico sem inconvenientes adversos ou com efeitos fisiológicos medicamente aceitáveis, que podem ser determinados pelos especialistas nas técnicas médicas. Vias de administração convencionais e farmacologicamente aceitáveis incluem distribuição directa para as vias do fígado, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intradérmica, oral e outras vias de administração

parentérica. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado.

As dosagens do vector viral dependerão principalmente de factores tais como a condição a ser tratada, a idade, peso e altura do doente, e pode por isso variar entre os doentes. Por exemplo, uma dosagem humana terapeuticamente eficaz do vector viral encontra-se geralmente no intervalo entre cerca de 20 e cerca de 100 mL de solução salina contendo concentrações de cerca de 1×10^9 até 1×10^{11} pfu/mL de vector de vírus. Uma dosagem humana preferida é estimada ser de cerca de 50 mL de solução salina a 2×10^{10} pfu/mL. A dosagem será ajustada para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais adversos. Os níveis de expressão do gene de *VLDLR* podem ser monitorizados para determinar a frequência da dosagem de administração.

Um passo opcional do método envolve a co-administração ao doente, quer concorrentemente com, ou antes ou após a administração do vector viral, de uma quantidade adequada para um modulador imunitário, que é preferencialmente de acção curta. O modulador imunitário seleccionado é aqui definido como um agente capaz de inibir a formação de anticorpos de neutralização dirigidos contra produtos do vector recombinante desta invenção e/ou capazes de inibir a eliminação de linfócitos T citolíticos (CTL) das células contendo vector. O modulador imunitário pode interferir com as interacções entre os subconjuntos dos auxiliares T (T_{H1} ou T_{H2}) e as células B para inibir a formação de anticorpo neutralizante. Alternativamente, o modulador imunitário pode ser seleccionado para inibir a interacção entre as células T_{H1} e os CTL para reduzir a ocorrência da eliminação de CTL do vector. Mais especificamente, o modulador imunitário interfere desejavelmente com, ou bloqueia, a função das células T CD4.


Os moduladores imunitários para utilização na inibição da formação de anticorpos neutralizantes podem ser seleccionados



com base na determinação do sub-tipo de imunoglobulina de qualquer anticorpo neutralizante produzido em resposta ao vector de adenovírus contendo *VLDLR*. Por exemplo, se o anticorpo neutralizante é um anticorpo mediado por T_{H2} , tal como IgA, o modulador imunitário desejavelmente suprime ou evita a interacção de T_{H2} com as células B. Alternativamente, se o anticorpo neutralizante induzido é um anticorpo mediado por T_{H1} , tal como IgG_{2A}, o modulador imunitário desejavelmente suprime ou evita a interacção de T_{H1} com as células B.

O anticorpo neutralizante que desenvolve uma resposta à administração de um vector viral desta invenção pode ser baseado no veículo utilizado para distribuir o vector e/ou na localização da distribuição. Por exemplo, a administração de vectores adenovirais através dos pulmões induz geralmente a produção de anticorpo neutralizante IgA. A administração de vectores adenovirais através do sangue geralmente induz anticorpo neutralizante IgG₁. A determinação do anticorpo neutralizante é prontamente determinada em ensaios do vector viral seleccionado em modelos animais. Nos casos em que é desejada a redução da eliminação de CTL dos vectores virais o modulador imunitário é seleccionado quanto à sua capacidade para suprimir ou bloquear células T_{H1} CD4⁺ para permitir a residência prolongada do vector viral *in vitro*.

A selecção do modulador imunitário pode assim ser baseada no mecanismo que se pensa vir a ser interrompido ou bloqueado. Os moduladores imunitários podem ser proteínas solúveis ou proteínas que ocorrem naturalmente, incluindo citoquinas, anticorpos monoclonais. Os moduladores imunitários podem ser produtos farmacêuticos convencionais. Os moduladores imunitários aqui identificados podem ser utilizados isoladamente ou em combinação um com o outro. Por exemplo, a ciclofosfamida e o modulador imunitário mais específico anticorpo monoclonal anti-CD4 podem ser co-administrados. Nesse caso, a ciclofosfamida serve como um agente para bloquear a activação de T_{H1} e a




expressão estabilizada do transgene para além do período do bloqueamento imunitário transiente.

Uma quantidade ou dosagem adequadas do modulador imunitário dependerá primeiramente da quantidade do vector recombinante contendo o gene *VLDLR* que é inicialmente administrado ao doente e do tipo de modulador imunitário seleccionado. Outros factores secundários tais como a condição a ser tratada, a idade, peso, estado geral de saúde, e estado imunitário do doente, também podem ser considerados por um médico na determinação da dosagem de modulador imunitário a ser distribuída ao doente.

Geralmente, por exemplo, uma dosagem humana terapêuticamente eficaz de um modulador imunitário de citocina, p. ex., IL-12 ou γ -IFN encontra-se geralmente no intervalo entre cerca de 0,5 μ g até cerca de 5 mg por cerca de 1×10^7 pfu/mL de vector de vírus. Podem ser determinadas várias dosagens por um especialista na técnica para equilibrar o benefício terapêutico contra quaisquer efeitos colaterais.

A. Anticorpos Monoclonais e Proteínas Solúveis

Preferencialmente, o método de inibição de uma resposta imunitária adversa ao vector de terapia génica envolve a inactivação específica de células CD4⁺. Preferencialmente, tais anticorpos bloqueadores são "humanizados" para evitar que o receptor desencadeie uma resposta imunitária contra o anticorpo bloqueador. Um "anticorpo humanizado" refere-se a um anticorpo possuindo as suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) e/ou outras porções das suas regiões estruturais do domínio variável da cadeia leve e/ou pesada, derivadas de uma imunoglobulina de um dador não humano, sendo as restantes partes da molécula derivadas da imunoglobulina derivadas de uma ou mais imunoglobulinas humanas. Tais anticorpos também podem incluir anticorpos caracterizados por uma cadeia pesada humanizada associada a uma cadeia leve não modificada de dador ou receptor,



ou uma cadeia leve quimérica, ou vice versa. Tal "humanização" pode ser realizada por métodos conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, G. E. Mark e E. A. Padlan, "Chap. 4. Humanization of Monoclonal Antibodies", The Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 113, Springer-Verlag, Nova Iorque (1994), pp. 105-133, que é aqui incorporada por referência.

Outros anticorpos adequados incluem aqueles que inibem especificamente ou empobrecem células CD4⁺, tais como um anticorpo dirigido contra a superfície da célula CD4. Foi demonstrado pelos inventores que o empobrecimento das células CD4⁺ inibe a eliminação de CTL do vector viral. Tais agentes de modulação incluem, mas não estão limitados a anticorpos de células anti-T, tais como anti-OKT3⁺ [ver. p. ex., Patente U.S. No. 4 658 019; Pedido de Patente Europeia No. 501 233, publicado em 2 de Setembro de 1992]. Ver Exemplo 2 abaixo, que emprega o anticorpo comercialmente disponível GK1.5 (No de Acesso ATCC TIB207) para empobrecer as células CD4⁺.

Alternativamente, qualquer agente que interfira com ou bloqueie as interacções necessárias para a activação de células B por células T_H, e assim a produção de anticorpos neutralizantes, é útil como um modulador imunitário de acordo com estes métodos. Por exemplo, a activação de células B por células T requer que ocorram certas interacções [F. H. Durie et al, *Immunol. Today*, **15**(9):406-410 (1994)], tais como a ligação do ligando CD40 na célula T auxiliar ao antigénio CD40 na célula B, e a ligação dos ligandos CD28 e/ou CTLA4 na célula T do antigénio B7 na célula B. Sem ambas as interacções a célula B não pode ser activada para induzir a produção do anticorpo neutralizante.

A interacção ligando CD40(CD40L)-CD40 é um ponto desejável para bloquear a resposta imunitária para vectores de terapia génica devido à sua actividade de largo espectro tanto na activação e função de células T auxiliares como na ausência de redundância na sua via de sinalização. Um método corrente

preferido da presente invenção envolve assim o bloqueamento transiente da interacção de CD40L com CD40 no momento da administração do vector adenoviral. Isto pode ser conseguido por tratamento com um agente que bloqueia o ligando CD40 na célula T_H e interfere com a ligação normal do ligando CD40 na célula T auxiliar com o antigénio CD40 na célula B. O bloqueamento da interacção CD40L-CD40 impede a activação das células auxiliares T que contribui para problemas com a estabilização e readministração do transgene.


Assim, um anticorpo contra o ligando CD40 (anti-CD40L) [disponível na Bristol-Myers Squibb Co; ver, p. ex. pedido de patente Europeia 555 880, publicada em 18 de Agosto de 1993] ou uma molécula solúvel de CD40 pode ser um modulador imunitário seleccionado neste método.

Alternativamente, um agente que bloqueia os ligandos CD28 e/ou CTLA4 presentes nas células T auxiliares interfere com a ligação normal desses ligandos com o antigénio B7 na célula B. Assim, uma forma solúvel de B7 ou um anticorpo contra CD28 ou CTLA4, p. ex., CTLA4-Ig [disponível da Bristol-Myers Squibb Co; ver p. ex., pedido de patente Europeia 606 217, publicado a 20 de Julho, 1994] pode ser o modulador imunitário seleccionado no método desta invenção. Este método possui vantagens maiores do que a administração de citocinas abaixo descrita para impedir a activação de T_{H2}, porque se dirige tanto a respostas imunitárias celulares como humorais a antigénios estranhos.

B. Citoquinas

Ainda podem ser empregues nesta invenção outros moduladores imunitários que inibem a função da célula T_H.

Assim, numa realização, pode ser administrado um modulador imunitário que inibe selectivamente a função do sub-conjunto T_{H1} de células T auxiliares CD4⁺, no momento da administração primária do vector viral. Um tal modulador imunitário é a



interleuquina-4 (IL-4). A IL-4 aumenta a actividade específica de antigénio de células T_{H2} à custa da função da célula T_{H1} [ver, p. ex., Yokota et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**:5894-5898 (1986); Patente dos Estados Unidos No. 5 017 691]. É previsível que outros moduladores que possam inibir a função da célula T_{H1} também sejam úteis nos métodos desta invenção.

Noutra realização, o modulador imunitário pode ser uma citocina que impeça a activação do sub-conjunto T_{H2} de células auxiliares T. O sucesso deste método depende da contribuição relativa que os isotipos Ig dependentes de T_{H2} desempenham na neutralização de vírus, cujo perfil pode ser afectado pela estirpe, a espécie do animal bem como pelo modo da distribuição do vírus e o órgão alvo.

Um modulador imunitário desejável que inibe selectivamente a função do sub-conjunto T_{H2} de células T $CD4^+$ no momento da administração primária do vector viral inclui a interleuquina-12 (IL-12). A IL-12 aumenta a actividade específica do antigénio de células T_{H1} à custa da função da célula T_{H2} [ver, p. ex., Pedido de Patente Europeia No. 441 900; P. Scott, *Science*, **260**: 496-497 (1993); R. Manetti et al., *J. Exp. Med.*, **177**: 1199 (1993); A. D'Andrea et al., *J. Exp. Med.*, **176**:1387 (1982)]. A IL-12 para utilização neste método é preferencialmente sob a forma de proteína. A IL-12 humana pode ser produzida de forma recombinante utilizando técnicas conhecidas ou pode ser obtida comercialmente. Alternativamente, pode ser projectada num vector viral (que opcionalmente pode ser o mesmo que o utilizado para expressar o transgene) e expressa numa célula alvo *in vivo* ou *ex vivo*.

A ablação específica para T_{H2} com IL-12 é particularmente eficaz em terapias génicas dirigidas ao pulmão em que IgA é a principal fonte de anticorpo neutralizante. Em terapia génica dirigida ao fígado tanto células T_{H1} como T_{H2} contribuem para a produção de anticorpos específicos para o vírus. Contudo, a

quantidade total de anticorpo neutralizante pode ser diminuída com IL-12.

Outro modulador imunitário seleccionado que realiza uma função semelhante é o interferão gama (IFN- γ) [S. C. Morris et al., *J. Immunol.*, **152**:1047-1056 (1994); F. P. Heinzel et al., *J. Exp. Med.*, **177**: 1505 (1993)]. Crê-se que IFN- γ medeia muitos dos efeitos biológicos de IL-12 através da secreção de macrófagos activados e células T auxiliares. O IFN- γ também inibe parcialmente a activação de T_{H2} estimulada por IL-4. O IFN- γ também pode ser obtido a partir de uma variedade de fontes comerciais.

Alternativamente, ele pode ser construído num vector viral e expresso numa célula alvo *in vivo* ou *ex vivo* utilizando técnicas de engenharia genética conhecidas.

Preferencialmente, tais moduladores imunitários de citocina estão sob a forma de proteínas humanas recombinantes. Estas proteínas podem ser produzidas por métodos existentes na técnica. Péptidos activos, fragmentos, subunidades ou análogos dos moduladores imunitários conhecidos aqui descritos, tais como IL-12 ou interferão gama, que partilham a função inibidora de T_{H2} destas proteínas, também serão úteis neste método quando os anticorpos neutralizantes são mediados por T_{H2}.

C. Outros Produtos Farmacêuticos

Também podem ser utilizados nos métodos da invenção outros moduladores imunitários ou agentes que inibem não especificamente a função imunitária, i.e., a ciclosporina A ou ciclofosfamida. Por exemplo, foi demonstrado que um percurso curto de ciclofosfamida interrompe com sucesso a activação tanto de células T auxiliares CD4 como de CD8 para a proteína da cápsula de adenovírus no momento da distribuição de vírus ao fígado. Como um resultado, a expressão do transgene foi prolongada e, a doses mais elevadas, foi impedida a formação do



anticorpo neutralizante, permitindo a readministração do vector ser bem sucedida. No pulmão a cilcofosfamida impediu a formação de anticorpos neutralizantes a todas as doses e estabilizou a expressão do transgene a uma dose elevada.

D. Administração do Modulador Imunitário


A administração opcional do modulador imunitário seleccionada p. ser repetida durante o tratamento com o vector de adenovirus recombinante contendo o gene de *VLDLR* humano durante o periodo de tempo em que o gene de *VLDLR* é expresso (como monitorizado por p. ex., níveis de *LDL*), ou com cada reforço do vector recombinante.

Assim, as composições e métodos desta invenção proporcionam um tratamento desejável para defeitos no metabolismo de *LDL*, proporcionando expressão estável do gene de *VLDLR* em hepatócitos humanos e a capacidade para re-administrar o vector como desejado sem induzir uma resposta imunitária indesejável no doente.

Os seguintes exemplos ilustram a construção e teste dos vectores virais e das inserções do gene receptor de *VLDL* da presente invenção e a utilização destes no tratamento de desordens metabólicas. Foi construído um adenovirus recombinante exemplificativo codificado o receptor de *VLDL* humano como descrito no Exemplo 1 abaixo. Estes exemplos são apenas ilustrativos e não limitam o âmbito da presente invenção.

Exemplo 1 - Construção e Purificação de H5.010CMVVLDLR

O ADNc para o receptor para a lipoproteína de muito baixa densidade (*VLDL*) humano [M. E. Gafvels *et al.*, citado acima: SEQ ID NO: 1] foi inserido na região de sítios de ligação múltiplos do plasmídeo pRc/CMV (obtido de Invitrogen Corp.). O plasmídeo resultante, pRc/CMVVLDLR foi digerido com as enzimas de



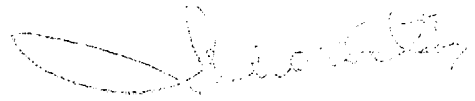
restrição *Sna*BI e *Not*I e foi isolado o fragmento de 4 kb contendo o promotor imediato-precocce de citomegalovírus (CMV) e o ADNc do receptor de *VLDL*.

O plasmídeo pAd, CMVlacZ [Kozarsky II, citado acima] foi digerido com *Sna*BI e *Not*I para remover o promotor de CMV e o ADNc de lacZ e foi isolada a estrutura de 5,6 kb. Os dois fragmentos foram ligados para gerar pAd.CMVVLDLR (Figs. 2 e 9; SEQ ID NO:3). O pAd.CMVVLDLR foi linearizado com *Nhe*I e co-transfectado em células 293 com ADN sub360 (derivado do adenovírus tipo 5), que foi digerido com *Xba*I e *Cla*I como anteriormente descrito [K. F. Kozarsky I e II citados acima].

Os adenovírus resultantes recombinantes, designados H5.010CMVVLDLR contêm a sequência de cerca do nucleótido 12 até cerca do 4390 de pAd.CMVVLDLR e as unidades de mapa de Ad.5 de 9-100 com uma pequena deleção no gene E3 (ver No. Acesso ao GenBank M73260 e discussão da Fig. 3). Este adenovírus recombinante foi isolado após dois ciclos de purificação de placas. O H5.010CMVVLDLR foi cultivado em células 293 e purificado por dois ciclos de centrifugação de densidade em cloreto de céσιο como anteriormente descrito [K. F. Kozarsky I e II citado acima]. O cloreto de céσιο foi removido fazendo passar o vírus através de uma coluna de dessalinização BioRad 10DG equilibrada com solução salina tamponada com fosfato.

Para experiências em coelhos o vírus foi utilizado purificado de fresco; para experiências em murganho o vírus foi utilizado fresco ou após ter sido adicionado glicerol de purificação em coluna para uma concentração final de 10% (v/v) e o vírus ter sido armazenado a -70°C até utilização.

Como descrito nos exemplos seguintes este vector de adenovírus recombinante foi introduzido nos fígados de coelhos WHHL e nos fígados dos murganhos com o receptor de *LDL* interrompido, para determinar a função *in vivo* do receptor de *VLDL* e para determinar a sua utilidade como uma terapia génica alternativa ou suplementar para deficiência do receptor de *LDL*.



Exemplo 2 - Outros Adenovírus Recombinantes

O H5.010CMVlacZ codificando o gene lacZ sob o controle do estimulador/promotor de CMV e o H5.010CBhLDLR codificando para o ADNC do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL) humano sob o controle do promotor de β -actina de galinha aumentado por CMV, foram preparados como anteriormente descrito [K. F. Kozarsky I e II, citados acima].


Exemplo 3 - Efeitos da Expressão Hepática do Receptor de VLDL no Coelho WHHL

O H5.010CMVVLDLR ou H5.010CMVlacZ (codificando para a β -galactosidase), obtidos como descrito nos Exemplos 1 e 2 foram utilizados para infusão intravenosa em coelhos WHHL [Camm Research] como se segue. Os coelhos foram sujeitos a infusão com $7,5 \times 10^{12}$ partículas de qualquer dos adenovírus recombinantes através de uma veia marginal da orelha no dia 0. Adicionalmente, dois coelhos New Zealand White (NZW) [Hazleton, Inc.] foram sujeitos a infusão com cada um dos vírus e sacrificados no dia 5 após infusão para documentar a extensão da transferência do gene no fígado.

Os coelhos foram mantidos no ciclo de 12 horas de luz/escuridão sob uma dieta de ração do laboratório Purina, fornecida em cada dia aproximadamente às 11:00. As amostras venosas foram obtidas através de uma veia marginal da orelha aproximadamente às 10:00 nos dias indicados.

A. Análises de Plasma

As amostras de plasma foram analisadas quanto ao colesterol total utilizando o Cholesterol HP kit and Precise standards (Boehringer Mannheim). Resumidamente, a análise por FPLC foi




realizada em 50 μ L de plasma de murganhos individuais ajustados para um volume de 250 μ L em tampão de coluna de FPLC (EDTA a 1 mM, NaCl a 154 mM, pH 8,0). As amostras diluídas (200 μ L) foram aplicadas em duas colunas de Superose (Pharmacia) em série a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, e foram recolhidas fracções de 1 mL. O conteúdo em colesterol foi analisado num ensaio em microplaca em amostras de 100 μ L. Foram adicionados às amostras 100 μ L de uma solução preparada de fresco contendo PIPES a 50 mM, pH 6,9, HDCBS a 7,8 g/L, 4-AAT a 0,51 g/L, ácido cólico a 1,27 g/L, Triton X-100 a 0,245%, KCl a 7,31 g/L e foram suplementadas com oxidase de colesterol 1,22 U/mL, esterase de colesterol a 7,64 U/mL e peroxidase a 245 U/mL, incubadas durante a noite à temperatura ambiente, e foi determinada a D.O. a 490 nm.

Os níveis de colesterol do plasma foram avaliados em cada um dos coelhos WHHL antes e após terem recebido o adenovírus recombinante. A Fig. 4A demonstra que os coelhos sujeitos a infusão com H5.010CMVlacZ não apresentavam alterações significativas nos níveis de colesterol. Contudo, após a infusão com H5.010CMVVLDLR os níveis de colesterol baixaram, com decréscimos máximos que variaram entre 140 e 420 mg/dL (Fig. 4B). Isto demonstra que a expressão do receptor de VLDL resulta em níveis de colesterol diminuídos em coelhos deficientes no receptor de LDL.

B. Análise Histoquímica

Foram embebidas em parafina porções de fígado, seccionadas e coradas com hematoxilina e eosina. Algumas porções foram congeladas frescas, seccionadas, fixadas em glutaraldeído, coradas com X-gal e levemente contracoradas com hematoxilina. Algumas secções congeladas frescas foram fixadas em metanol e depois coradas quer com um anticorpo policlonal anti- β -




galactosidase (5 linha-3 linha), um anticorpo policlonal anti-receptor de *LDL* humano, ou com um anticorpo policlonal anti-receptor *VLDL*, seguido por um anticorpo anti-coelho conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Jackson Immunoresearch) como anteriormente descrito [K. F. Kozarsky I e II citados acima]. A coloração com Óleo Vermelho O foi realizada em secções congeladas frescas fixadas durante 1 minuto em formaldeído a 37%, depois lavadas e coradas em Óleo Vermelho O (3 partes de Óleo Vermelho O a 0,5% em álcool isopropílico/2 partes de água) durante 10 minutos. Os cortes foram contracorados em hematoxilina e montados em solução aquosa.

A análise de imunofluorescência dos coelhos sujeitos a infusão mostrou que aproximadamente 50% dos hepatócitos do coelho sujeito a infusão com H5.010CMVlacZ expressaram β -galactosidase, o tecido do fígado do coelho sujeito a infusão com H5.010CMVVLDLR tinha uma percentagem de hepatócitos ligeiramente superior expressando o receptor de *VLDLR*. De acordo com a análise por transferência de Northern apresentando pouca ou nenhuma expressão de ARNm do receptor de *VLDL* [M. E. Gafvels *et al*, citado acima], o fígado do coelho sujeito a infusão com lacZ não apresentou reactividade com o anticorpo anti-receptor de *VLDL*.

Exemplo 4 - Efeitos da Expressão Hepática de Curta Duração do Receptor de *VLDL* em Murganhos com o Receptor de *LDL* Interrompido

Murganhos C57BL/6 e murganhos com o receptor de *LDL* interrompido (Jackson Labs) foram sujeitos a infusão intravenosa com 0,5 a $1,0 \times 10^{10}$ partículas de adenovírus recombinante através da veia da cauda e os níveis de colesterol foram monitorizados antes e após infusão.

Especificamente, três murganhos foram sujeitos cada um a infusão quer com H5.010CMVlacZ, H5.010CMVVLDLR, ou H5.010CBhLDLR (codificando o ADNc do receptor de *LDL* humano). Este último

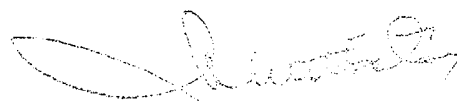


vírus foi incluído como um controlo para confirmar resultados publicados [Kozarsky I e II citados acima]. Foram obtidas amostras de plasma por sangria retro-orbital utilizando tubos capilares heparinizados. Os murganhos com o receptor de *LDL* interrompido foram mantidos numa dieta rica em colesterol composta de ração de murganho Purina suplementada com 1,25% de colesterol, 7,5% de manteiga de cacau, 7,5% de caseína, e 0,5% de colato (1,25% de colesterol na dieta) durante pelo menos 3 semanas imediatamente a seguir ao desmame antes de serem iniciadas as experiências. Os murganhos foram sacrificados no dia 5 após a infusão.

Os tecidos do fígado foram analisados por imunofluorescência quanto a expressão do transgene por técnicas descritas no Exemplo 3, e os níveis de colesterol no plasma foram medidos de modo semelhante ao descrito. Para o fraccionamento de lipoproteínas, foram misturados os triplicados de plasma de murganhos com o receptor de *LDL* interrompido, sujeitos a centrifugação de densidade, as fracções foram recolhidas, e o conteúdo em colesterol foi determinado por meios convencionais.

A análise por imunofluorescência revelou níveis moderados de expressão de β -galactosidase em murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVlacZ, e níveis superiores de expressão de receptor de *LDL* humano e de receptor de *VLDL* em murganhos sujeitos a infusão com H5.010CBh*LDLR* e H5.010CMV*VLDLR*, respectivamente.

Os níveis de colesterol diminuíram levemente no controlo, murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVlacZ (Fig.5), provavelmente devido a efeitos da infusão de adenovírus recombinante não relacionados com o transgene, que podem resultar em hepatotoxicidade em murganhos [Y. Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 4407-4411 (Maio de 1994)]. No entanto, em contraste com a diminuição observada nos murganhos controlo, os níveis de colesterol caíram significativamente para 50% dos valores pré-infusão nos murganhos sujeitos a infusão com



H5.010CBhLDLR no dia 5 após a infusão. Os níveis de colesterol nos murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVLDLR também diminuíram, para aproximadamente 60% dos valores pré-infusão. A análise posterior das lipoproteínas do plasma mostrou que nos murganhos tratados com H5.010CBhLDLR, os níveis de LDL evidenciaram-se, com decréscimos adicionais nas fracções IDL e VLDL (Fig. 6). Os murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVLDLR apresentaram um maior decréscimo na fracção VLDL com menos decréscimo em LDL.

Em conjunto estes resultados indicam que a expressão hepática do receptor de VLDL resulta numa remoção aumentada de VLDL do plasma, resultando em decréscimos nas quantidades de lipoproteínas para as quais VLDL é o precursor (isto é, IDL e LDL), e uma queda geral no colesterol total do plasma.

Exemplo 5 - Efeitos da Expressão Hepática de Longo Termo do Receptor de VLDL em Murganhos com o Receptor de LDL Interrompido

De modo a obter níveis de colesterol mais próximos dos observados em doentes FH e coelhos WHHL, murganhos com o receptor de LDL interrompido (Jackson Labs) foram mantidos numa dieta rica em colesterol composta por ração de murganho Purina suplementada com colesterol a 0,2%, óleo de coco a 10%, e colato a 0,05% (0,2% de colesterol na dieta). Os níveis de colesterol nestes murganhos variou desde 930 a 1550 mg/dL, enquanto os murganhos numa dieta de 1,25% de colesterol (Exemplo 4) possuíam níveis de 1900 a 3100 mg/dL.

O vírus descongelou imediatamente antes da sua utilização e foi diluído com PBS a uma concentração de 1×10^{12} partículas/mL. Cada um de três murganhos foi sujeito a infusão intravenosamente com 0,1 mL de vírus contendo 1×10^{11} partículas de um adenovírus recombinante com E1 removido codificando para β -galactosidase (H5.010CMVlacZ) ou receptor LDL humano (H5.010CBhLDLR), e os lípidos do soro foram seguidos ao longo do tempo. Nos dias

[Handwritten signature]

indicados, os murganhos foram anestesiados com metoxiflurano e o sangue foi colhido em tubos capilares heparinizados por punção retro-orbital da veia plexus.

A coloração imunofluorescente mostrou que a maior parte dos hepatócitos expressava o produto do transgene, seja β -galactosidase, receptor de *LDL* humano, ou receptor de *VLDL*. A coloração com hematoxilina e eosina de secções do fígado revelou morfologia essencialmente normal no murganho sujeito a infusão com H5.010CMVlacZ. No entanto, para ambos os murganhos sujeitos a infusão com H5.010CBh*LDLR* e H5.010CMV*VLDLR*, os hepatócitos pareciam possuir vacúolos internos. Quando o tecido foi analisado com coloração com óleo Vermelho O, uma coloração para lípidos neutros, o fígado de animais sujeitos a infusão com o receptor apresentou claramente a acumulação de grandes gotas de lípido quando comparado com o do controlo sujeito a infusão com H5.010CMVlacZ. Isto sugeriu que a expressão a curto termo de níveis elevados do receptor de *LDL* ou receptor de *VLDL* nestes murganhos deficientes em receptor de *LDL* resultou numa acumulação intracelular de lípidos.


Para confirmar as actividades biológicas dos produtos transgénicos, o colesterol do plasma foi seguido antes e depois da administração de adenovírus recombinante. A Fig.7A mostra que os níveis de colesterol no soro nos murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVlacZ demonstraram uma flutuação característica mas não significativa ao longo do tempo, reflectida em alterações menores de todas as fracções de lipoproteínas (HDL, IDL/*VLDL*, e *LDL*). Em contraste, murganhos sujeitos a infusão com H5.010CBh*LDLR* possuem um decréscimo grande mas não transiente em colesterol (ver, Fig. 7B). Particularmente, estes murganhos demonstraram grandes decréscimos de colesterol no plasma que duraram aproximadamente 2 semanas. Os níveis de colesterol diminuíram 3 vezes (de 966 para 353 mg/dL) e 7 vezes (de 1554 a 219 mg/dL) e voltaram à linha de base 3 semanas após a infusão. O decréscimo no colesterol do soro é reflectido na diminuição

Handwritten signature

coordenada de LDL no soro. Este efeito não específico da infecção de adenovirus quando não são administrados de forma coordenada imunomoduladores foi previamente descrita e é provavelmente devida a alterações na função hepática que ocorrem como resultado de inflamação associada. Murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVLDLR apresentaram grandes decréscimos no colesterol do plasma que são semelhantes em magnitude aos observados em murganhos sujeitos a infusão com H5.010CBhLDLR (Fig. 7C), com decréscimos máximos de mais de 4 vezes (de 1186 a 288 mg/dL e de 1453 a 299 mg/dL). Surpreendentemente, os níveis de colesterol no plasma não voltaram à linha de base 3 semanas após a infusão. A alteração nos níveis de colesterol do plasma nos murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVLDLR (Fig. 7D) foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) ao longo de 9 semanas a seguir à infusão (a própria duração da experiência).

O soro de murganhos individuais foi analisado por FPLC para determinar os efeitos da expressão do receptor de VLDL nas fracções de lipoproteína. No dia 3 após a infusão, não eram detectáveis as fracções VLDL e LDL; ao longo do tempo, a fracção LDL recuperou ligeiramente, embora mesmo às 10 semanas após infusão, a altura do pico de LDL era ligeiramente inferior do que a altura do pico de HDL. VLDL permaneceu não detectável apesar de diferenças menores poderem escapar à detecção devido às limitações de sensibilidade do ensaio de colesterol. Os picos de LDL espelharam os níveis de colesterol total no plasma, e confirmaram que o abaixamento prolongado do colesterol do plasma era acompanhado por decréscimos sustentados dos níveis de VLDL e LDL. Estes resultados sugerem que a expressão do receptor de VLDL no fígado é uma terapia eficaz para hipercolesterolemia.

Ao mesmo tempo da infusão em murganhos com o receptor de LDL interrompido, foram sujeitos a infusão murganhos normais C57B1/6 com cada um dos adenovirus recombinantes. Estes murganhos foram sacrificados a vários tempos após a infusão, e os tecidos do fígado foram colhidos para análise directa da



expressão do transgene utilizando histoquímica de X-gal para detectar a expressão de β -galactosidase e imunofluorescência realizada para medir a expressão do receptor de LDL. Os tecidos colhidos três dias após a infusão do vírus demonstraram tanto a expressão de β -galactosidase como do receptor de LDL humano em pelo menos 80% dos hepatócitos.

Em cada experiência, o sinal específico do vector foi substancialmente maior do que o observado em animais antes da transdução do gene ou após infusão com idênticas quantidades de um adenovírus expressando um gene irrelevante. Para lacZ e receptor de LDL, a expressão do transgene diminuiu para níveis não detectáveis pelo dia 21 e estava associada com o desenvolvimento de um infiltrado mononuclear autolimitado no fígado que apresentou pico no dia 10. O infiltrado consistia numa inflamação portal e lobular, acompanhada pela presença de corpos apópticos. A extensão da patologia foi indistinguível entre os murganhos sujeitos a infusão com lacZ ou receptor de LDL. O tempo de duração da expressão do receptor de LDL é consistente com a grande diminuição inicial do colesterol no plasma e subsequente retorno à linha de base.

Em contraste, dois murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVVLDLR expressavam o receptor de VLDL a níveis elevados. A percentagem de hepatócitos pode ter decrescido ligeiramente quando comparada com os murganhos do dia 5. Estes resultados sugerem que o decréscimo sustentado dos níveis de colesterol no plasma nos murganhos sujeitos a infusão com H5.010CMVVLDLR foi devido a expressão sustentada do receptor de VLDL.

Exemplo 6 - Estudos de "Turnover"

Para caracterizar adicionalmente os efeitos da expressão hepática do receptor de VLDL no metabolismo lipoproteico, foram efectuados estudos de "turnover" como se segue.

Murganhos com o receptor de LDL interrompido foram sujeitos a infusão com adenovírus recombinante após 3 semanas de dieta rica em colesterol como descrito no exemplo 4. Três ratos foram injectados cada um com os adenovírus lacZ e receptor de VLDL; um murganho foi injectado com o adenovírus do receptor de LDL. No dia 5 após a infusão, os murganhos foram injectados através da veia da cauda com aproximadamente 8×10^6 cpm de LDL humano marcado com ^{125}I , e $1,6 \times 10^5$ cpm de VLDL humano marcado com ^{131}I num volume total de 0,2 mL. Foi obtida uma amostra de sangue 1 minuto após a injeção dos marcados radioactivamente, e designada como amostra "tempo zero". O sangue foi colhido em tubos capilares heparinizados nos tempos indicados, e a radioactividade que permanecia foi determinada utilizando um contador gama.

A infusão do adenovírus do receptor de LDL levou a uma eliminação acelerada de LDL quando comparada com a infusão do adenovírus de lacZ, consistente com um estudo prévio em murganhos com o receptor de LDL interrompido [S. Ishibashi et al., *J. Clin. Invest.*, **92**: 883-893 (1993)]. Do mesmo modo, a eliminação de VLDL foi acelerada em animais tratados com o receptor de LDL quando comparada com murganhos sujeitos a infusão com lacZ. O "turnover" de LDL em murganhos sujeitos a infusão com o receptor de VLDL foi indistinguível de murganhos sujeitos a infusão com lacZ, consistente com resultados *in vitro* que indicam que LDL não é um ligando para o receptor de VLDL [T. Yamamoto et al., *Trends in Cardiovascular Medicine*, **3**: 144-148 (1993); F. Batley et al., *J. Biol. Chem.*, **269**: 23268-23273 (1994)]. A eliminação de VLDL em murganhos sujeitos a infusão com o receptor de VLDL foi ligeiramente mais rápida do que a de murganhos sujeitos a infusão com lacZ, mas significativamente mais lenta do que em murganhos sujeitos a infusão com o receptor de LDL.

Como acima discutido, o "turnover" de VLDL em murganhos sujeitos a infusão com o adenovírus do receptor de VLDL foi

[Handwritten signature]

significativamente mais rápido do que em murganhos sujeitos a infusão com o lacZ embora a magnitude deste efeito fosse muito menor do que a observada em animais tratados com o vírus do receptor de LDL. Isto sugere que a eliminação de VLDL em circulação mediada pelo receptor de VLDL pode não ser a única via que leva à diminuição de VLDL no soro. Um potencial mecanismo é secreção-recaptura, que ocorre com a incorporação hepática de quilomicrons que permaneceram [T. Willnow & J. Herz, *J. Mol. Med.*, **73**: 213-220 (1995); H. Shimano *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **93**: 2215-2223 (1994)], e resultará em decréscimo de secreção de VLDL e reduzidos níveis de VLDL no plasma. Um segundo mecanismo pode envolver a interação do receptor de VLDL com a proteína associada ao receptor (RAP) [Battey, citado acima; H. Mokuno *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**: 13238-13243 (1994)] que interage com uma variedade de receptores dentro da célula, aparentemente para evitar a ligação do ligando antes do receptor atingir a superfície da célula [G. Bu *et al.*, *EMBO J.*, **14**: 2269-2280 (1995)]. É possível que os elevados níveis de receptor de VLDL expresso nos fígados de murganhos sujeitos a infusão com adenovírus ultrapasse a RAP disponível, de modo a que o receptor de VLDL se ligue a ligando sintetizado de novo (apoE, seja livre ou em associação com lípido) na célula, e evitando a sua secreção no plasma. Os efeitos da expressão hepática do receptor de VLDL no colesterol total do plasma assim como nos níveis de colesterol em lipoproteína demonstram que o receptor de VLDL pode desempenhar um papel mais importante no metabolismo *in vivo*.


Exemplo 7 - Estabilidade da Expressão do Receptor de VLDL

Esta experiência ilustra a persistência relativa de transgenes em murganhos.

Murganhos com o receptor de *LDL* interrompido foram injectados intravenosamente no dia 0 com 1×10^{11} partículas de H5.010CMV*lacZ*, H5.010CBh*LDLR*, ou H5.010CMV*VLDLR*. Os murganhos foram sacrificados nos dias indicados após injeção (3, 10 ou 21), e secções do fígado congeladas de fresco foram coradas com X-gal para detectar a expressão do gene *lacZ*, e com anticorpo anti-receptor de *LDL* ou anticorpo anti-receptor de *VLDL*, seguido por um segundo anticorpo conjugado com fluoresceína para detectar o receptor de *LDL* e o receptor de *VLDL*, respectivamente.

A análise do fígado colhido 3 dias após infusão do vírus revelou proteína do receptor de *VLDL* em >80% dos hepatócitos; o sinal fluorescente brilhante, que se localizou no perímetro da célula estava ausente antes do gene ser transferido e em tecidos de animais infectados com adenovírus contendo *lacZ* ou receptor de *LDL*. A expressão da proteína do receptor de *VLDL* foi notavelmente estável com proteína recombinante detectada em aproximadamente 5 a 10% de hepatócitos de tecido colhido 105 dias depois da infusão do vírus. Isto está surpreendentemente em contraste com os resultados obtidos pelo *lacZ* e receptor de *LDL* do adenovírus, em que a expressão do transgene se extinguiu a níveis não detectáveis em três semanas de transferência de gene. A expressão do receptor de *VLDL* permaneceu detectável durante a duração da experiência (22 semanas).

O ADN genómico foi isolado de fígado de rato, digerido com *EcoRI*, e sujeito a transferência de Southern [K. Kozarski et al., *J.Biol.Chem.*, **269**:13695-13702 (1994)] para monitorizar a presença ao longo do tempo de sequências de ADN adenoviral. As sequências de adenovírus foram detectadas utilizando o kit Genius de Boehringer Mannheim, seguido por detecção por quimioluminescência. Em murganhos C57BL/6 sujeitos a infecção com o adenovírus *lacZ*, o ADN viral diminuiu rapidamente com o tempo, estacionando a níveis quase não detectáveis (0,05 cópias por célula) até ao dia 70 após a infusão. Os murganhos sujeitos



a infusão com o receptor VLDL tinham níveis de ADN ligeiramente mais altos, mas um tempo semelhante de perda de sequências de adenovírus. Estudos adicionais de hibridação de ADN mostraram que a maioria do ADN de adenovírus inicialmente deixado no fígado não é integrado no genoma do murgancho (resultados não apresentados), no entanto, este ensaio não pode excluir algum nível de integração.

A análise histopatológica do tecido do fígado de murganchos sujeitos a infusão com o receptor VLDL do vírus revelou inflamação e células apoptóticas em pontos de tempo mais iniciais. A duração e a extensão das observações patológicas eram indistinguíveis de tecidos de fígado de murganchos sujeitos a infusão com vírus do lacZ e do receptor de LDL. Às 15 e 22 semanas após a infusão, no entanto, tecido de fígado de murgancho sujeito a infusão com receptor de VLDL apresentou acumulações discerníveis de lípidos neutrais, como demonstrado por coloração com hematoxilina e eosina assim como com óleo vermelho O. Foram observadas alterações semelhantes pouco frequentes em murganchos com o receptor de LDL interrompido sujeitos a infusão com PBS, receptor de VLDL e/ou adenovírus lacZ. Não foram observadas acumulações de lípidos em fígados de murganchos normais C57BL/6 sujeitos a infusão com o vírus do receptor de VLDL, apesar da expressão do transgene a longo prazo ser indistinguível da observada em murganchos com o receptor de LDL interrompido. Isto indica que a expressão do receptor de VLDL por si só não é suficiente para as alterações na acumulação de lípidos observada em murganchos com o receptor de LDL interrompido; em vez disso, existe alguma acumulação de lípido em murganchos com o receptor de VLDL interrompido que foram mantidos numa dieta rica em colesterol durante ≥ 18 semanas, que é acelerada por expressão prolongada do receptor de VLDL.

Amostras de plasma de murganchos sujeitos a infusão com o receptor de VLDL de adenovírus foram analisados quanto à presença de anticorpos dirigidos contra a proteína receptor de



VLDL. Apenas um murgancho em doze produziu anticorpos contra o receptor de VLDL apesar da presença de um elevado nível de anticorpos contra as proteínas da cápsula do adenovírus em cada animal que recebeu o vírus. Animais sujeitos a infusão com o receptor de VLDL do adenovírus desencadearam uma resposta de CTL contra as proteínas do adenovírus indistinguível da obtida de animais sujeitos a infusão seja com adenovírus do lacZ ou do receptor de LDL. Estes murganchos, no entanto, não desencadearam uma resposta de CTL contra a proteína do receptor de VLDL. Assim, o desenvolvimento de uma resposta de CTL ao transgene após a infusão de adenovírus recombinante é dependente da antigenicidade do transgene específico no animal tratado.

Exemplo 8: Resposta Imunitária Humoral e Celular Contra Adenovírus e Transgenes

A. Resposta Imunitária Humoral

Dois murganchos com o receptor de LDL interrompido (K020 e K027) ou dois murganchos normais C57BL/6 foram injectados através da veia da cauda com 1×10^{11} partículas de H5.010CBhLDLR no dia 0 e foram colhidas amostras de soro antes da injeção (pre), e nos dias 10, 24, 39, 52 e 70 depois da injeção para os murganchos interrompidos e no dia 21 para os murganchos C57BL/6. Foram realizadas transferências de Western como previamente descrito [K. Kozarsky et al., *J. Biol. Chem.* **269**: 13695-13702 (1994); K. Kozarsky et al., *Som. Cell and Molec. Genet.*, **19**: 449-458 (1993)]. Para detectar anticorpos anti-adenovírus, foi utilizado adenovírus purificado como antigénio. O controlo positivo (+) foi anti-soro de coelho isolado após infusão intravenosa de H5.010CBhLDLR purificado. O controlo negativo (-) foi soro pré-imunizado de coelho. As transferências de Western com β -galactosidase foram efectuadas utilizando proteína purificada


(Sigma), com um anticorpo monoclonal específico para β -galactosidase (Sigma) como um controlo positivo.

Anticorpos dirigidos contra o receptor de LDL humano foram detectados utilizando lisados preparados de células 24-23, uma linha de células 3T3 que foi sujeita a transdução com retrovírus codificando para o receptor de LDL humano. Para a detecção de anticorpos anti-receptor de VLDL, foi preparado um lisado a partir de células HeLa dois dias após a infecção com H5.010 CMVVLDLR.

Todos os murganhos sujeitos a infusão com 1×10^{11} partículas de adenovírus recombinante desenvolveram anticorpos contra proteínas da cápsula de adenovírus, com as bandas maiores a corresponder a hexon, penton e fibra. Todos os murganhos sujeitos a infusão com H5.010CBhLDLR desenvolveram anticorpos contra a proteína do receptor de LDL humano com os murganhos com o receptor de LDL interrompido desenvolvendo consistentemente um mais elevado título de anticorpos do que os murganhos C57BL/6. Os anticorpos dos murganhos com o receptor de LDL interrompido reagiram de forma cruzada com proteína do receptor de LDL de murganho, enquanto anticorpos de murganhos C57BL/6 (que expressam o receptor LDL normal de murganho) não reagem.

Isto sugere que o receptor VLDL, embora tenha sido utilizada a sequência de humano e não de murganho, não era imunogénica nestes murganhos. As sequências de aminoácido dos receptores de LDL humanos e de murganho são aproximadamente idênticas em 78%, enquanto os receptores de VLDL humano e de murganho são > 94% idênticos. Esta semelhança de sequências aumentada contribui provavelmente para a ausência de desenvolvimento de anticorpos contra o receptor de VLDL humano apesar do elevado nível de expressão no fígado de murganho como resultado da infusão de H5.010CMVVLDLR.

Estes resultados demonstram que os animais podem produzir uma resposta imunitária humoral específica para o produto do transgene assim como para as proteínas virais codificadas pelo




adenovirus injectado. Proporciona também evidência indirecta de activação específica pelo antigénio de células T auxiliares, que é normalmente necessária para o desenvolvimento de células B, maduras, secretoras de anticorpos.

B. Respostas Imunitárias Celulares

Este estudo analisou animais após infusão com o adenovirus de receptor de LDL para activação de CTLs tanto para antigénios virais como para o produto do transgene, receptor de LDL humano.

Os ensaios foram realizados como descrito em Y. Yang et al., *Immunity*, **1**: 433-442 (1994). As células alvo expressando proteínas de vaccinia recombinante foram produzidas por infecção com vaccinia recombinante produzido como se segue. O ADNc do receptor de VLDL (no plasmídeo pRC/CMV) foi subclonado no sítio *HindIII* de Bluescript KS+. O ADNc de CFTR [J. R. Riordan et al., *Science*, **245**: 1066-1073 (1989) foi clonado no sítio *PstI* de Bluescript KS+ (Stratagene). O ADNc do receptor de LDL no vector pUC19 [T. Yamamoto et al., *Cell*, **39**: 27-38 (1984)] foi excisado com as enzimas de restrição *HindIII* e *Sac I* e ligado nos sítios *HindIII* e *SacI* de Bluescript KS+. Cada um dos ADNc foi então excisado utilizando as enzimas *SacII* e *KpnI* e clonado nos sítios *SacII* e *KpnI* de uma forma modificada do vector de expressão de vaccinia pSC11 [S. Chakrabarti et al., *Molec. Cell Biol.*, **5**: 3403-3409 (1985)]. A vaccinia recombinante controlo, VRG, expressa uma glicoproteína do vírus da raiva e foi preparada como descrito em T. Wiktor et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**: 7194-7198 (1984).

Foram detectados CTLs para alvos específicos num ensaio convencional de libertação de ⁵¹crómio (⁵¹Cr) em que células alvo compatíveis com MHC foram infectadas com adenovirus recombinante ou vírus vaccinia que expressam produtos de gene únicos relevantes. A Fig. 10 apresenta um exemplo de um ensaio de libertação de ⁵¹Cr em que a % de lise específica é medida como



uma função do aumento da proporção efector alvo (Fig. 10B), assim como um sumário dos dados cumulativos (Fig. 10A). Os esplenócitos de murganhos C57BL/6 sujeitos a infusão com adenovírus recombinante contendo receptor de LDL humano ou CFTR humano foram avaliados quanto à sua capacidade de lisar alvos infectados com adenovírus recombinante, para medir actividade contra proteínas virais, ou com vírus vaccinia contendo receptor de LDL, para medir a actividade contra a proteína do receptor de LDL. A actividade citolítica foi demonstrada com linfócitos de animais infectados com o vírus do receptor de LDL para atingir células infectadas com o mesmo vírus. Não foi detectada citólise para simular alvos infectados apoiando a especificidade do ensaio. Estas mesmas células efectoras demonstraram actividade citolítica significativa contra alvos infectados com o vírus vaccinia do receptor de LDL que não estava presente quando infectadas com um vaccinia controlo. Estas experiências forneceram evidência forte para a presença de CTL activada contra o receptor de LDL humano em murganhos C57BL/6 após terapia génica.

Exemplo 9 - Melhoramento da Transferência de Genes Mediada por Adenovírus durante a Segunda Administração com IL-12 e IFN- τ em Pulmão de Murganho

Os adenovírus recombinantes H5.010CMVlacZ e H5.010CBALP (gene da fosfatase alcalina expresso a partir do promotor melhorado da β -actina de CMV na estrutura de sub360) foram utilizados neste exemplo. Cada vírus semelhante expressa um gene repórter diferente cuja expressão pode ser discriminada da do primeiro gene repórter.

Murganhos fêmea C57B1/6 (6~8 semanas de idade) foram infectados com suspensões de H5.010CBALP (1×10^9 pfu em 50 μ L de PBS) através da traqueia no dia 0 e do mesmo modo com H5.010CMVlacZ no dia 28. Um grupo desses murganhos foi utilizado

como controlo. Outro grupo de murganhos foi precisamente empobrecido em células CD4⁺ por injeção i.p. de anticorpo contra células CD4⁺ (GK1.5; ATCC N° TIB207, diluição de ascites 1:10) na altura do início da terapia génica (dias -3, 0, e +3). Um terceiro grupo de murganhos foi injectado com IL-12 (1 µg intratraqueal ou 2 µg, injeções i.p.) na altura da primeira administração do vírus (dias 0 e +1). Um quarto grupo de murganhos foi injectado com interferão gama (1 µg intratraqueal ou 2 µg, injeções i.p.) na altura da primeira administração do vírus (dias 9 e +1).

Quando os murganhos foram subsequentemente eutanizados e necropsiados aos dias 3, 28, ou 31, os tecidos do pulmão foram preparados para criossecções, enquanto a lavagem bronquial alveolar (BAL) e nódulos linfáticos mediastinais (MLN) foram colhidos para ensaios imunológicos.


A. Criossecções

Os tecidos de pulmão foram avaliados quanto à expressão da fosfatase alcalina por coloração histoquímica seguindo os procedimentos de Y. Yang *et al.*, acima citado.

A instilação de vírus com fosfatase alcalina (10⁹ pfu) na via aérea de todos os grupos de murganhos C57Bl/6 resultou num elevado nível de expressão do transgene na maior parte das vias de condução de ar que diminui para níveis indetectáveis pelo dia 28. A perda da expressão do transgene mostrou ser devida a eliminação mediada por CTL dos hepatócitos geneticamente modificados [Y. Yang *et al.*, acima citado].

Nos murganhos controlo, não foi detectada expressão do gene três dias após a segunda administração do vírus, isto é, no dia 31.

A administração de vírus aos animais empobrecidos em células CD4⁺ foi associada a elevados níveis de expressão do



transgene que era estável durante um mês. A expressão do segundo vírus foi detectada no dia 31.

O elevado nível inicial de transferência de genes diminuiu depois de cerca de um mês nos murganhos tratados com IL-12; no entanto, em contraste com o controlo, o nível elevado de transferência de genes para as células epiteliais da via aérea foi conseguido quando o vírus foi re-administrado a animais tratados com IL-12 no dia 28, como verificado nos resultados de dia 31.

Os animais tratados com interferão gama foram virtualmente indistinguíveis dos animais tratados com IL-12 uma vez que foi conseguida transferência de gene eficiente após uma segunda administração do vírus.

B. Ensaios Imunológicos - MNL

Linfócitos de MLN do grupo controlo e do grupo tratado com IL-12 dos murganhos C57B1/6 colhidos 28 dias após administração de H5.010CBALP foram re-estimulados *in vitro* com H5.010CMVlacZ inactivado por UV a 10 partículas/ célula durante 24 horas. Os sobrenadantes isentos de células foram ensaiados quanto à presença de IL-2 ou IL-4 em células HT-2 (uma linha de células dependente de IL-2 ou IL-4) [Y. Yang *et al.*, citado acima]. A presença de IFN- γ no mesmo sobrenadante da cultura de linfócitos foi medida em células L929 como descrito [Y. Yang *et al.*, citado acima]. O índice de estimulação (S.I.) foi calculado dividindo a cpm de ^3H -timidina incorporada por células HT-2 cultivadas em sobrenadantes de linfócitos re-estimulados com vírus pela incorporada por células HT-2 cultivadas em sobrenadantes de linfócitos incubados em meio sem antigénio.

Os resultados são apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1


Incorporação de ³ H-timidina (cpm±DP)			litro IFN-γ (IU/ml) ^d	
	Meio	H0.510CMVlacZ	S.I.	
C57B1/6	175±40	2084±66	11,91	80
Anti-IL2 (1:5000)		523±81	2,98	
Anti-IL4 (1:5000)		1545±33	8,83	
C57B1/6 + IL12	247±34	5203±28	21,07	160
Anti-IL2 (1:5000)		776±50	3,14	
Anti-IL4 (1:5000)		4608±52	18,66	

A estimulação de linfócitos de nódulos linfáticos regionais com ambos os adenovírus recombinantes levou à secreção de citocinas específicas para a activação dos subconjuntos de células T auxiliares T_{H1} (i.e., IL-2 e IFN-γ) e T_{H2} (i.e., IL-4) (Tabela 1).

A análise de linfócitos de animais tratados com IL-12 estimulados *in vitro* com vírus revelou uma secreção aumentada de IL-2 e IFN-γ e uma diminuição relativa na produção de IL-4 quando comparada com animais que não receberam IL-12 (i.e., a proporção IL-2/IL-4 foi aumentada de 3 para 6 quando é utilizado IL-12; Tabela 1).

C. Ensaio Imunológico - BAL

Amostras de BAL obtidas de animais 28 dias após a primeira exposição ao vírus recombinante foram avaliadas quanto à neutralização de anticorpos contra adenovírus e isotipos de anticorpos anti-adenovírus como se segue. Os mesmos quatro grupos de murganhos C57B1/6, isto é, controlo, empobrecidos para CD4⁺, tratados com IL-12 e tratados com IFN-γ, foram infectados com H5.010CBALP. A neutralização de anticorpos foi medida em diluições seriadas de amostras de BAL (100 μL) que foram misturadas com H5.010CMVlacZ (1x10⁶ pfu em 20 μL), incubadas durante 1 hora a 37°C, e aplicadas a 80% de células HeLa



confluentes em placas de 96 poços (2×10^4 células por poço). Após 60 minutos de incubação a 37°C , foram adicionados a cada poço 100 μL de DMEM contendo FBS a 20%. As células foram fixadas e coradas para a expressão de β -galactosidase no dia seguinte.

Todas as células foram positivas para lacZ na ausência de anticorpos anti-adenovirais.

O isótipo do anticorpo específico para adenovírus foi determinado em BAL utilizando o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA). Resumidamente, placas de 96 poços foram revestidas com 100 μL de PBS contendo 5×10^9 partículas de H5.010CMVlacZ durante 18 horas a 4°C . Os poços foram lavados 5 vezes com PBS. Após bloquear com 200 μL de BSA a 2% em PBS, as placas foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com amostras BAL diluídas 1:10 durante 90 minutos a 4°C . Seguidamente, os poços foram extensivamente lavados e de novo cheios com 100 μL de anti-IgG ou IgA de murganho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído de 1:1000. As placas foram incubadas, subsequentemente lavadas 5 vezes, e foram adicionados 100 μL da solução de substrato (fosfato de p-nitrofenilo, PNPP) em cada poço. A conversão do substrato foi interrompida pela adição de 50 μL de EDTA a 0,1 M. As placas foram lidas a 405 nm.

Os resultados são graficamente apresentados nas Figs. 11A a 11C, que sumarizam o título de anticorpos neutralizantes, e as quantidades relativas (DO_{405}) de IgG e IgA presente em amostras BAL. O título de anticorpos neutralizantes para cada amostra foi reportado como a maior diluição com menos de 50% de células coradas de azul.

Como demonstrado na primeira barra das Figs. 11A a 11C, as citocinas identificadas na Tabela 1 acima foram associadas nos murganhos controle com o aparecimento de anticorpos contra proteínas de adenovírus em BAL de ambos os isotipos IgG e IgA que eram capazes de neutralizar o vector recombinante Ad5 humano num ensaio *in vitro* até uma diluição de 1:800.



Como apresentado na segunda barra dos gráficos das Figs. 11A a 11C, o empobrecimento transiente de células CD4⁺ inibiu a formação de anticorpo neutralizante (Fig. 11A) e anticorpo IgA específico para vírus (Fig. 11C) em 80 vezes, permitindo assim que ocorresse uma transferência de gene eficiente após uma segunda administração de vírus. A Fig. 11B apresenta uma ligeira inibição também de IgG.

Mais importante, como apresentado na terceira barra dos três gráficos, IL-12 bloqueia selectivamente a expressão de IgA específica para o antigénio (Fig. 11C), sem impacto significativo na formação de IgG (Fig. 11B). Isto foi concordante com uma redução de 32 vezes do anticorpo neutralizante (Fig. 11A).

Os animais tratados com interferão gama (quarta barra das Figs. 11A a 11B) foram virtualmente indistinguíveis dos animais tratados com IL-12 na medida em que a IgA específica de vírus (Fig. 11C) e anticorpo neutralizante (Fig. 11A) diminuíram quando comparado com os animais controlo não tratados com citoquina, mas não na extensão obtida com os tratados com IL-12.

Estes estudos demonstraram que a inibição da função CD4⁺ na altura da primeira exposição ao vírus é suficiente para evitar a formação de anticorpos bloqueantes. A redução concordante de anticorpo neutralizante com IgA anti-viral sugere que a imunoglobulina do subtipo IgA é em primeiro lugar responsável pelo bloqueio da transferência de genes.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

- (i) REQUERENTE: Trustees of University of Pennsylvania
Wilson, James, M.

Kozarsky, Karen, F.

Strauss, Jerome F.

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Métodos e Composições de Terapia Génica para o Tratamento de Defeitos no Metabolismo Lipoproteico

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 8

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

- (A) ENDEREÇADO: Howson and Howson
- (B) RUA: Spring House Corporate Cntr., PO Box 457
- (C) CIDADE: Spring House
- (D) ESTADO: Pensilvânia
- (E) PAÍS: EUA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 19477

(v) FORMATO DE LEITURA EM COMPUTADOR

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA INFORMÁTICO: Patentin Release #1.0, Versão #1.30

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO

- (A) NÚMERO DE PEDIDO:
- (B) DATA DO FICHEIRO:
- (C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DE PEDIDO ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE PEDIDO: US 08/393 734
- (B) DATA DE FICHEIRO: 24-FEV-1995

(vii) ADVOGADO/AGENTE DE INFORMAÇÃO:

- (A) NOME: Bak, Mary E.
- (B) NÚMERO DE REGISTO: 31 215
- (C) REFERÊNCIA/NÚMERO DE REGISTO: GHVPH009CIP1.PCT

(ix) INFORMAÇÃO DE TELECOMUNICAÇÕES:

- (A) TELEFONE: 215-540-9200
- (B) TELEFAX: 215-540-5818

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 3656 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: CDS
- (B) LOCALIZAÇÕES 392..3010

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:1:

TCC	AGG	AAC	TTT	GTA	TGC	AAT	GGC	CAG	GAT	GAC	TGC	AGC	GAT	GGC	AGT	940
Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Cys	Asn	Gly	Gln	Asp	Asp	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	
		170					175					180				
GAT	GAG	CTG	GAC	TGT	GCC	CCG	CCA	ACC	TGT	GGC	GCC	CAT	GAG	TTC	CAG	988
Asp	Glu	Leu	Asp	Cys	Ala	Pro	Pro	Thr	Cys	Gly	Ala	His	Glu	Phe	Gln	
ias					190					195						
TGC	AGC	ACC	TCC	TCC	TGC	ATC	CCC	ATC	AGC	TGG	GTA	TGC	GAC	GAT	GAT	1036
Cys	Ser	Thr	Ser	Ser	Cys	Ile	Pro	Ile	Ser	Trp	Val	Cys	Asp	Asp	Asp	
200					205					210					215	
GCA	GAC	TGC	TCC	GAC	CAA	TCT	GAT	GAG	TCC	CTG	GAG	CAG	TGT	GGC	CGT	1084
Ala	Asp	Cys	Ser	Asp	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Cys	Gly	Arg	
				220					225					230		
CAG	CCA	GTC	ATA	CAC	ACC	AAG	TGT	CCA	GCC	AGC	GAA	ATC	CAG	TGC	GGC	1132
Gln	Pro	Val	Ile	His	Thr	Lys	Cys	Pro	Ala	Ser	Glu	Ile	Gln	Cys	Gly	
			235					240					245			
TCT	GGC	GAG	TGC	ATC	CAT	AAG	AAG	TGG	CGA	TGT	GAT	GGG	GAC	CCT	GAC	1180
Ser	Gly	Glu	Cys	Ile	His	Lys	Lys	Trp	Arg	Cys	Asp	Gly	Asp	Pro	Asp	
		250					255					260				
TGC	AAG	GAT	GGC	AGT	GAT	GAG	GTC	AAC	TGT	CCC	TCT	CGA	ACT	TGC	CGA	1228
Cys	Lys	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Asn	Cys	Pro	Ser	Arg	Thr	Cys	Arg	
	265					270					275					
CCT	GAC	CAA	TTT	GAA	TGT	GAG	GAT	GGC	AGC	TGC	ATC	CAT	GGC	AGC	AGG	1276
Pro	Asp	Gln	Phe	Glu	Cys	Glu	Asp	Gly	Ser	Cys	Ile	His	Gly	Ser	Arg	
280					285					290					295	
CAG	TGT	AAT	GGT	ATC	CGA	GAC	TGT	GTC	GAT	GGT	TCC	GAT	GAA	GTC	AAC	1324
Gln	Cys	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp	Cys	Val	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Asn	
300					305					310						
TGC	AAA	AAT	GTC	AAT	CAG	TGC	TTG	GGC	CCT	GGA	AAA	TTC	AAG	TGC	AGA	1372
Cys	Lys	Asn	Val	Asn	Gln	Cys	Leu	Gly	Pro	Gly	Lys	Phe	Lys	Cys	Arg	
			315					320					325			
AGT	GGA	GAA	TGC	ATA	GAT	ATC	AGC	AAA	GTA	TGT	AAC	CAG	GAG	CAG	GAC	1420
Ser	Gly	Glu	Cys	Ile	Asp	Ile	Ser	Lys	Val	Cys	Asn	Gln	Glu	Gln	Asp	
		330					335					340				
TGC	AGG	GAC	TGG	AGT	GAT	GAG	CCC	CTG	AAA	GAG	TGT	CAT	ATA	AAC	GAA	1468
Cys	Arg	Asp	Trp	Ser	Asp	Glu	Pro	Leu	Lys	Glu	Cys	His	Ile	Asn	Glu	
	345					350					355					
TGC	TTG	GTA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	TCT	CAT	ATC	TGC	AAA	GAC	CTA	GTT	1516
Cys	Leu	Val	Asn	Asn	Gly	Gly	Cys	Ser	His	Ile	Cys	Lys	Asp	Leu	Val	
360					365					370					375	
ATA	GGC	TAC	GAG	TGT	GAC	TGT	GCA	GCT	GGG	TTT	GAA	CTG	ATA	GAT	AGG	1564
Ile	Gly	Tyr	Glu	Cys	Asp	Cys	Ala	Ala	Gly	Phe	Glu	Leu	Ile	Asp	Arg	
					385					390						
AAA	ACC	TGT	GGA	GAT	ATT	GAT	GAA	TGC	CAA	AAT	CCA	GGA	ATC	TGC	AGT	1612
Lys	Thr	Cys	Gly	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Asn	Pro	Gly	Ile	Cys	Ser	
			395					400					405			

CAA ATT TGT ATC AAC TTA AAA GGC GGT TAC AAG TGT GAA TGT AGT CGT Gln Ile Cys Ile Asn Leu Lvs Gly Gly Tyr Lys Cys Glu Cys Ser Arg 410 415 420	1660
GCC TAT CAA ATG GAT CTT GCT ACT GGC GTG TGC AAG GCA CTA GGC AAA Ala Tyr Gln Met Asp Leu Ala Thr Gly Val Cys Lys Ala Val Gly Lys 425 430 435	1708
GAG CCA AGT CTG ATC TTC ACT AAT CGA AGA GAC ATC AGG AAG ATT GGC Glu Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg Arg Asp Ile Arg Lys Ile Gly 440 445 450 455	1756
TTA GAG AGC AAA GAA TAT ATC CAA CTA GTT GAA CAG CTA AGA AAC ACT Leu Glu Arg Lys Glu Tyr Ile Gln Leu Val Glu Gln Leu Arg Asn Thr 460 465 470	1804
GTG GCT CTC GAT GCT GAC ATT GCT GCC CAG AAA CTA TTC TGG GCC GAT Val Ala Leu Asp Ala Asp Ile Ala Gln Lys Leu Phe Trp Ala Asp 475 480 485	1852
CTA AGC CAA AAG GCT ATC TTC AGT GCC TCA ATT GAT GAC AAG GTT GGT Leu Ser Gln Lys Ala Ile Phe Ser Ala Ser Ile Asp Asp Lys Val Gly 490 495 500	1900
AGA CAT GTT AAA ATG ATC GAC AAT GTC TAT AAT CCT GCA GCC ATT GCT Arg His Val Lys Met Ile Asp Asn Val Tyr Asn Pro Ala Ala Ile Ala 505 510 515	1948
GTT GAT TGG GTG TAC AAG ACC ATC TAC TGG ACT CAT GCG GCT TCT AAG Val Asp Trp Val Tyr Lys Thr Ile Tyr Trp Thr Asp Ala Ala Ser Lys 520 525 530 535	1996
ACT ATT TCA GTA GCT ACC CTA GAT GGA ACC AAG AGG AAG TTC CTG TTT Thr Ile Ser Val Ala Thr Leu Asp Gly Thr Lys Arg Lys Phe Leu Phe 540 545 550	2044
AAC TCT GAC TTG CGA GAG CCT GCC TCC ATA GCT GTG GAC CCA CTG TCT Asn Ser Asp Leu Arg Glu Pro Ala Ser Ile Ala Val Asp Pro Leu Ser 555 560 565	2092
GGC TTT GTT TAC TGG TCA GAC TGG GGT GAA CCA GCT AAA ATA GAA AAA Gly Phe Val Tyr Trp Ser Asp Trp Gly Glu Pro Ala Lys Ile Glu Lys 570 575 580	2140
GCA GGA ATG AAT GGA TTC GAT AGA CGT CCA CTG GTG ACA GCG GAT ATC Ala Gly Met Asn Gly Phe Asp Arg Arg Pro Leu Val Thr Ala Asp Ile 585 590 595	2188
CAG TGG CCT AAC GGA ATT ACA CTT GAC CTT ATA AAA AGT CGC CTC TAT Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp Leu Ile Lys Ser Arg Leu Tyr 600 605 610 615	2236
TGG CTT GAT TCT AAG TTG CAC ATG TTA TCC AGC GTG GAC TTG AAT GGC Trp Leu Asp Ser Lys Leu His Met Leu Ser Ser Val Asp Leu Asn Gly 620 625 630	2284
CAA GAT CGT AGG ATA GTA CTA AAG TCT CTG GAG TTC CTA GCT CAT CCT Gln Asp Arg Arg Ile Val Leu Lys Ser Leu Glu Phe Leu Ala His Pro 635 640 645	2332
CTT GCA CTA ACA ATA TTT GAC GAT CGT GTC TAC TGG ATA GAT GGG GAA Leu Ala Leu Thr Ile Phe Glu Asp Arg Val Tyr Trp Ile Asp Gly Glu 650 655 660	2380

Handwritten signature

AAT GAA GCA GTC TAT GGT GCC AAT AAA TTC ACT GGA TCA GAG CAT GCC Asn Glu Ala Val Tyr Gly Ala Asn Lys Phe Thr Gly Ser Glu His Ala 665 670 675	2428
ACT CTA GTC AAC AAC CTG AAT GAT GCC CAA GAC ATC ATT GTC TAT CAT Thr Leu Val Asn Asn Leu Asn Asp Ala Gln Asp Ile Ile Val Tyr His 680 685 690 695	2476
GAA CTT GTA CAG CCA TCA GGT AAA AAT TGG TGT GAA GAA GAC ATG GAG Glu Leu Val Gln Pro Ser Gly Lys Asn Trp Cys Glu Glu Asp Met Glu 690 700 705 710	2524
AAT GGA GGA TGT GAA TAC CTA TGC CTG CCA GCA CCA CAG ATT AAT GAT Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu Pro Ala Pro Gln Ile Asn Asp 715 720 725	2572
CAC TCT CCA AAA TAT ACC TGT TCC TGT CCC AGT GGG TAC AAT GTA GAG His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Asn Val Glu 730 735 740	2620
GAA AAT GGC CGA GAG TGT CAA AGT ACT GCA ACT ACT GTG ACT TAC AGT Glu Asn Gly Arg Asp Cys Gln Ser Thr Ala Thr Thr Val Thr Tyr Ser 745 750 755	2668
GAG ACA AAA GAT ACC AAC ACA ACA GAA ATT TCA GCA ACT AGT GGA CTA Glu Thr Lys Asp Thr Asn Thr Thr Glu Ile Ser Ala Thr Ser Gly Leu 760 765 770 775	2716
GTT CCT GGA GGG ATC AAT GTG ACC ACA GCA GTA TCA GAG GTC AGT GTT Val Pro Gly Gly Ile Asn Val Thr Thr Ala Val Ser Glu Val Ser Val 780 795 790	2764
CCC CCA AAA GGG ACT TCT GCC GCA TGG GCC ATT CTT CCT CTC TTG CTC Pro Pro Lys Gly Thr Ser Ala Ala Trp Ala Ile Leu Pro Leu Leu leu 795 800 805	2812
TTA GTG ATG GCA GCA GTA GGT GGC TAC TTG ATG TGG CGG AAT TGG CAA Leu Val Met Ala Ala Val Gly Gly Tyr Leu Met Trp Arg Asn Trp Gln 810 815 820	2860
CAC AAG AAC ATG AAA AGC ATG AAC TTT GAC AAT CCT GTG TAC TTG AAA His Lys Asn Met Lys Ser Met Asn Phe Asp Asn Pro Val Tyr Leu Lys 825 830 835	2908
ACC ACT GAA GAG GAC CTC TCC ATA GAC ATT GGT AGA CAC AGT GCT TCT Thr Thr Glu Glu Asp Leu Ser Ile Asp Ile Gly Arg His Ser Ala Ser 840 845 850 855	2956
GTT GGA CAC ACG TAC CCA GCA ATA TCA GTT GTA AGC ACA GAT GAT GAT Val Gly His Thr Tyr Pro Ala Ile Ser Val Val Ser Thr Asp Asp Asp 860 865 870	3004
CTA GCT TGACTTCTGT GACAAATGTT GACCTTTGAG GTCTAAACAA ATAATACCCC Leu Ala	3060
CGTCGGAATG GTAACCGAGC CAGCAGCTGA AGTCTCTTTT TCTCCTCTC GGCTGGAAGA	3120
ACATCAAGAT ACCTTTGCGT GGATCAAGCT TGCTGTACTT GACCGTTTTT ATATTACTTT	3180
TGTAAATATT CTTGTCCACA TTCTACTTCA GCTTTGGATG TGGTTACCGA GTATCTGTAA	3240
CCCTTGAATT TCTAGACAGT ATTGCCACCT CTGGCCAAAT ATGCACTTTC CCTAGAAAAGC	3300

Handwritten signature

CATATTCCAG CAGTGAAACT TGTGCTATAG TGTATAACCAC CTGTACATAC ATTGTATAGG	3360
CCATCTGTAA ATATCCCAGA GAACAATCAC TATTCTTAAG CACTTTGAAA ATATTTCTAT	3420
GTAATTATT GTAACTTTT TCAATGGTTG GGACAATGGC AATAGGACAA AACGGGTTAC	3480
TAAGATGAAA TTGCCAAAAA AATTTATAAA CTAATTTTGG TACGTATGAA TGATATCTTT	3540
GACCTCAATC CAGGTTTGCA AAGACTGAGT GTTCAAATA CTGTACATTT TTTTCAAGT	3600
GCTAAAAAAT TAAACCAAGC AGCTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA	3656

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 873 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

[Handwritten signature]

Met Ciy Thr Par Ala Leu Trp Ala Val Trp Leu Leu Leu Ala Leu Cys
1 5 10 15
Trp Ala Arg Arg Glu Ser Gly Ala Thr Gly Thr Gly Arg Lys Ala Lys
20 25 30
Cys Glu Arg Ser Gln Phe Gln Cys Thr Asn Gly Arg Cys Ile Thr Leu
35 40 45
Leu Trp Lys Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Val Asp Gly Ser Asp Glu
50 55 60
Lys Asn Val Val Lys Lys Thr Cys Ala Glu Ser Asp Phe Val Cys Asn
65 70 75 80
Asn Gly Gln Cys Val Pro Ser Arg Trp Lys Cys Asp Gly Asp Pro Asp
85 90 95
Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Ser Pro Glu Gln Cys His Met Arg Thr
100 105 110
Cys Arg Ile His Glu Ile Ser Cys Gly Ala His Ser Thr Gln Cys Ile
115 120 125
Pro Val Ser Trp Arg Cys Asp Gly Glu Asn Asp Cys Asp Ser Gly Glu
130 135 140
Asp Glu Glu Asn Cys Gly Asn Ile Thr Cys Ser Pro Asp Glu Phe Thr
145 150 155 160
Cys Ser Ser Gly Arg Cys Ile Ser Arg Asn Phe Val Cys Asn Gly Gln
165 170 175
Asp Asp Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Leu Asp Cys Ala Pro Pro Thr
180 185 190
Cys Gly Ala His Glu Phe Gln Cys Ser Thr Ser Ser Cys Ile Pro Ile
195 200 205
Ser Trp Val Cys Asp Asp Asp Ala Asp Cys Ser Asp Gln Ser Asp Glu
210 215 220
Ser Leu Glu Gln Cys Gly Arg Gln Pro Val Ile His Thr Lys Cys Pro
225 230 235 240
Ala Ser Glu Ile Gln Cys Gly Ser Gly Glu Cys Ile His Lys Lys Trp
245 250 255
Arg Cys Asp Gly Asp Pro Asp Cys Lys Asp Gly Ser Asp Glu Val Asn
260 265 270
Cys Pro Ser Arg Thr Cys Arg Pro Asp Gln Phe Glu Cys Glu Asp Gly
275 280 285
Ser Cys Ile His Gly Ser Arg Gln Cys Asn Gly Ile Arg Asp Cys Val
290 295 300
Asp Gly Ser Asp Glu Val Asn Cys Lys Asn Val Asn Gln Cys Leu Gly
305 310 315 320

Pro Gly Lys Phe Lys Cys Arg Ser Gly Glu Cys Ile Asp Ile Ser Lys
325 330 335

Val Cys Asn Gln Glu Gln Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Leu
340 345 350

Lys Glu Cys His Ile Asn Glu Cys Leu Val Asn Asn Gly Gly Cys Ser
355 360 365

His Ile Cys Lys Asp Leu Val Ile Gly Tyr Glu Cys Asp Cys Ala Ala
370 375 380

Gly Phe Glu Leu Ile Asp Arg Lys Thr Cys Gly Asp Ile Asp Glu Cys
385 390 395 400

Gln Asn Pro Gly Ile Cys Ser Gln Ile Cys Ile Asn Leu Lys Gly Gly
405 410 415

Tyr Lys Cys Glu Cys Ser Arg Ala Tyr Gln Met Asp Leu Ala Thr Gly
420 425 430

Val Cys Lys Ala Val Gly Lys Glu Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg
435 440 445

Arg Asp Ile Arg Lys Ile Gly Leu Glu Arg Lys Glu Tyr Ile Gln Leu
450 455 460

Val Glu Gln Leu Arg Asn Thr Val Ala Leu Asp Ala Asp Ile Ala Ala
465 470 475 480

Gln Lys Leu Phe Trp Ala Asp Leu Ser Gln Lys Ala Ile Phe Ser Ala
485 490 495

Ser Ile Asp Asp Lys Val Gly Arg His Val Lys Met Ile Asp Asn Val
500 505 510

Tyr Asn Pro Ala Ala Ile Ala Val Asp Trp Val Tyr Lys Thr Ile Tyr
515 520 525

Trp Thr Asp Ala Ala Ser Lys Thr Ile Ser Val Ala Thr Leu Asp Gly
530 535 540

Thr Lys Arg Lys Phe Leu Phe Asn Ser Asp Leu Arg Glu Pro Ala Ser
545 550 555 560

Ile Ala Val Asp Pro Leu Ser Gly Phe Val Tyr Trp Ser Asp Trp Gly
565 570 575

Glu Pro Ala Lys Ile Glu Lys Ala Gly Met Asn Gly Phe Asp Arg Arg
580 585 590

Pro Leu Val Thr Ala Asp Ile Gln Trp Pro Asn Gly Ile Thr Leu Asp
595 600 605

Handwritten signature

Leu Ile Lys Ser Arg Leu Tyr Trp Leu Asp Ser Lys Leu His Met Leu
610 615 620

Ser Ser Val Asp Leu Asn Gly Gln Asp Arg Arg Ile Val Leu Lys Ser
625 630 635 640

Leu Glu Phe Leu Ala His Pro Leu Ala Leu Thr Ile Phe Glu Asp Arg
645 650 655

Val Tyr Trp Ile Asp Gly Glu Asn Glu Ala Val Tyr Gly Ala Asn Lys
660 665 670

Phe Thr Gly Ser Glu His Ala Thr Leu Val Asn Asn Leu Asn Asp Ala
675 680 685

Gln Asp Ile Ile Val Tyr His Glu Leu Val Gln Pro Ser Gly Lys Asn
690 695 700

Trp Cys Glu Glu Asp Met Glu Asn Gly Gly Cys Glu Tyr Leu Cys Leu
705 710 715 720

Pro Ala Pro Gln Ile Asn Asp His Ser Pro Lys Tyr Thr Cys Ser Cys
725 730 735

Pro Ser Gly Tyr Asn Val Glu Glu Asn Gly Arg Asp Cys Gln Ser Thr
740 745 750

Ala Thr Thr Val Thr Tyr Ser Glu Thr Lys Asp Thr Asn Thr Thr Glu
755 760 765

Ile Ser Ala Thr Ser Gly Leu Val Pro Gly Gly Ile Asn Val Thr Thr
770 775 780

Ala Val Ser Glu Val Ser Val Pro Pro Lys Gly Thr Ser Ala Ala Trp
785 790 795 800


Ala Ile Leu Pro Leu Leu Leu Leu Val Met Ala Ala Val Gly Gly Tyr
805 810 815

Leu Met Trp Arg Asn Trp Gln His Lys Asn Met Lys Ser Met Asn Phe
820 825 830

Asp Asn Pro Val Tyr Leu Lys Thr Thr Glu Glu Asp Leu Ser Ile Asp
835 840 845

Ile Gly Arg His Ser Ala Ser Val Gly His Thr Tyr Pro Ala Ile Ser
850 855 860

Val Val Ser Thr Asp Asp Asp Leu Ala
865 870



(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 9592 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADnc

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

[Handwritten signature]

GAATTCGCTA GCATCATCAA TAATATACCT TATTTTGGAT TGAAGCCAAT ATGATAATGA 60
GGGGGTGGAG TTTGTGACGT GGC CGGGGGG GTGGGAACGG GCGGGGTGAC GTAGTAGTGT 120
GGCGGAAGTG TGATGTTGCA AGTGTGGCGG AACACATGTA AGCGACGGAT GTGGCAAAAG 180
TGACGTTTTT GGTGTGCGCC GGTGTACACA GGAAGTGACA ATTTTCGCGC GGTTTTAGGC 240
GGATGTTGTA CTALATTGG GCGTAACCGA GTAAGATTTG GCCATTTTCG CGGGAAAAC 300
GAATAAGAGG AASTGAAATC TGAATAATTT TGTGTTACTC ATAGCGCGTA ATATTTGTCT 360
AGGGAGATCA GCGTGCAGST CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG 420
CCCAACGACC CCGGCGCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA 480
GGGACTTTCC ATTCAGTCA ATCGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTGCCCA CTTGGCAGTA 540
CATCAAGTGT ATCATATGCC AACTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC 600
GCCTGGCATT ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTAATTGGCA GTACATCTAC 660
GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA 720
TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG 780
TTTTGGCACC AAAATCAACC GGAAGTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG 840
CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT 900
AGAGAACCCA CTGCTTAACT GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA 960
AGCTTCTCTG CGGGCCGCGG GTGCGGGTCG TCGCTACCGG CTCTCTCCGT TCTGTGCTCT 1020
CTTCTGCTCT CGGCTCCCA CCCCTCTCC CTTCCTCCT CTCCCCTTG CTCCCCTCT 1080
CTGACGCGCC TGCATTATTT TCTGCCGCA GCTCGGCTTG CACTGCTGCT GCAGCCCGGG 1140
GAGGTGGCTG GGTGGGTGGG GAGGAGACTG TGCAAGTTGT AGGGGAGGGG GTGCCCTCTT 1200
CTTCCCCTCT CCCTTCCCA GCCAAGTGGT TCCCCTCCTT CTCCCCCTTT CCCCTCCAC 1260
CCCCCACCTT CTTCCTCTTT CGGAAGGGCT GGTAAGTTGT CGTGCGGAGC GAACGGCGGC 1320
GGCGGGCGCG GCGGCGGCAC CATCCAGCGG GGCACCATGG GCACGTCCGC GCTCTGGGCC 1380
GTCTGGCTGC TGCTCGCGCT GTGCTGGGCG CCCC GGGAGA GCGGCGCCAC CGGAACCGGG 1440
AGAAAAGCCA AATGTGAACC CTCCAATTC CAGTGCACAA ATGGTCGCTG TATTACGCTG 1500
TTGTGGAAAT GTGATGGGGA TCAAGACTGT GTTACGGCA GTGATGAAA GAACTGTGTA 1560
AAGAAGACGT GTGCTGAATC TGACTTCGTG TGCAACAATG GCCAGTGTGT TCCCAGCCGA 1620
TGGAAGTGTG ATGGAGATCC TGAAGTGCAG GATGGTTCAG ATGAAAGCCC AGAACAGTGC 1680
CATATGAGAA CATGCCGCAT ACATGAAATC AGCTGTGGCG CCCATTCTAC TCAGTGTATC 1740
CCAGTGTCTT GGAGATGTGA TGGTGAAAAT GATTTGTGACA GTGGAGAAGA TGAACAAAAC 1800

[Handwritten signature]

TGTGGCAATA TAACATGTAG TCCCAGCAGG TTCACCTGCT CCAGTGGCCG CTGCATCTCC 1860
AGGAACTTTG TATGCAATGG CCAGGATGAC TGCAGCGATG GCAGTGATGA GCTGGACTGT 1920
GCCCCGCCAA CCTGTGGCCG CCATGAGTTC CAGTGCAGCA CCTCCTCCTG CATCCCCATC 1980
AGCTGGGTAT GCGACGATGA TGCAGACTGC TCCGACCAAT CTGATGAGTC CCTGGAGCAG 2040
TGTGGCCGTC AGCCAGTAT ACACACCAAG TGTCCAGCCA GCGAAATCCA GTGCGGCTCT 2100
GGCGAGTGCA TCCATAAATA CTGGCGATGT GATGGGGACC CTGACTGCAA GGATGGCAGT 2160
GATGAGGTCA ACTGTCTTTC TCGAACTTGC CGACCTGACC AATTTGAATG TGAGGATGGC 2220
AGCTGCATCC ATGGCAATAT CCAAGTGTAA TGGTATCCGAC ACTGTGTGCA TGGTCCGAT 2280
GAAGTCAACT GCAAAATAT CAATCAGTGC TTGGGCCCTG GAAAATCAA GTGCAGAAGT 2340
GGAGAATGCA TAGATATAT CAAAGTATGT AACCAGGAGC AGGACTGCAG GGACTGGAGT 2400
GATGAGCCCC TGAAGAGATG TCATATAAAC GAATGCTTGG TAAATAATGG TGGATGTCTT 2460
CATATCTGCA AAGACCTAST TATAGGCTAC GAGTGTGACT GTGCAGCTGG GTTTGAACTG 2520
ATAGATAGGA AAACCTGTTC AGATATTGAT GAATGCCAAA ATCCAGGAAT CTGCAGTCAA 2580
ATTTGTATCA ACTTAAAGSC CGGTTACAAG TGTGAATGTA GTCGTGCCTA TCAAATGGAT 2640
CTTGCTACTG GCGTGTGCAA GGCAGTAGGC AAAGAGCCAA GTCTGATCTT CACTAATCGA 2700
AGAGACATCA GGAAGATTGG CTTAGAGAGG AAAGAATATA TCCAAGTAGT TGAACAGCTA 2760
AGAAACACTG TGGCTCTGSA TGCTGACATT GCTGCCAGA AACTATTCTG GGCCGATCTA 2820
AGCCAAAAGG CTATCTTCAG TGCCTCAATT GATGACAAGG TTGGTAGACA TGTTAAATG 2880
ATCGACAATG TCTATAATCC TGCAGCCATT GCTGTTGATT GGGTGTACAA GACCATCTAC 2940
TGGACTGATG CGGCTTCTAA GACTATTTCA GTAGCTACCC TAGATGGAAC CAAGAGGAAG 3000
TTCCTGTTTA ACTCTGACTT GCGAGAGCCT GCCTCCATAG CTGTGGACCC ACTGTCTGGC 3060
TTTGTTTACT GGTGAGACTG GGGTGAACCA GCTAAAATAG AAAAAGCAGG AATGAATGGA 3120
TTCGATAGAC GTCCACTGGT GACAGCGGAT ATCCAGTGGC CTAACGGAAT TACACTTGAC 3180
CTTATAAAAA GTCGCCTCTA TTGGCTTGAT TCTAAGTTGC ACATGTTATC CAGCGTGGAC 3240
TTGAATGGCC AAGATCGTAG GATAGTACTA AAGTCTCTGG AGTTCCTAGC TCATCCTCTT 3300
GCACTAACAA TATTTGAGGA TCGTGTCTAC TGGATAGATG GGGAAAATGA AGCAGTCTAT 3360
GGTGCCAATA AATTCAGTGG ATCAGAGCAT GCCACTCTAG TCAACAACCT GAATGATGCC 3420
CAAGACATCA TTGTCTATCA TGAAGTTGTA CAGCCATCAG GTAAAAATG GTGTGAAGAA 3480
GACATGGAGA ATGGAGGATG TGAATACCTA TGCCTGCCAG CACCACAGAT TAATGATCAC 3540
TCTCCAAAAT ATACCTGTTC CTCTCCCAGT GGGTACAATG TAGAGGAAAA TGGCCGAGAC 3600

Handwritten signature or mark

TGTCAAAGTA CTGCAACTAC TGTGACTTAG AGACAAAAGA TACGAACACA ACAGAAATTT 3660
CAGCAACTAG TGGACTAGTT CCTGGAGGGA TCAATGTGAC CACAGCAGTA TCAGAGGTCA 3720
GTGTTCOCOC AAAAGGGACT TCTGCCGCAT GGGCCATTCT TCCTCTCTTG CTCTTACTGA 3780
TGGCAGCAGT AGGTGGCTAC TTGATGTGGC GGAATTGGCA ACACAAGAAC ATGAAAAGCA 3840
TGAACCTTGA CAATCCTGTG TACTTGAAAA CCACTGAAGA GGACCTCTCC ATAGACATTG 3900
GTAGACACAG TGCTTCTGTT GGACACACGT ACCCAGCAAT ATCAGTTGTA AGCACAGATG 3960
ATGATCTAGC TTGACTTCTG TGACAAATGT TGACCTTTGA GGTCTAAACA AATAATACCC 4020
CCGTCGGAAAT GGTAACCGAG CCAGCAGCTG AAGTCTCTTT TTCTTCCTCT CGGCTGGAAG 4080
AACATCAAGA TACCTTTGCG TGGATCAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCC ACTAGTAACG 4140
GCCGCCAGTG TGCTGGAATT CTGCAGATAT CCATCACACT GCGCGCCGCG GGGATCCAGA 4200
CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACT AGAATGCAGT GAAAAAATG 4260
CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA 4320
ACAAGTTAAC AACAACAATT GCATTCATTT TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA 4380
GGTTTTTTCG GATCCTCTAG AGTCGACCTG CAGGCTGATC TGGAAGGTGC TGAGGTACGA 4440
TGAGACCCGC ACCAGGTGCA GACCCTGCGA GTGTGGCGGT AAACATATTA GGAACCAGCC 4500
TGTGATGCTG GATGTGACCG AGGAGCTGAG GCCCGATCAC TTGGTGCTGG CCTGCACCCG 4560
CGCTGAGTTT GGCTCTAGCG ATGAAGATAC AGATTGAGGT ACTGAAATGT GTGGGCGTGG 4620
CTTAAGGGTG GGAAAGAATA TATAAGGTGG GGGTCTTATG TAGTTTTGTA TCTGTTTTGC 4680
AGCAGCCGCC GCCGCCATGA GCACCAACTC GTTTGATGGA AGCATTGTGA GCTCATATTT 4740
GACAACGCGC ATGCCCCCAT GGGCCGGGGT GCGTCAGAAT GTGATGGGCT CCAGCATTGA 4800
TGGTCGCCCC GTCCTGCCCC CAACTCTAC TACCTTGACC TACGAGACCG TGTCTGGAAC 4860
GCCGTTGGAG ACTGCAGCCT CCGCCGCGC TTCAGCCGCT GCAGCCACCG CCCGCGGGAT 4920
TGTGACTGAC TTTGCTTTCC TGAGCCCGCT TGCAAGCAGT GCAGCTTCCC GTTCATCCGC 4980
CCGCGATGAC AAGTTGACGG CTCTTTTGGC ACAATTGGAT TCTTTGACCC GGGAACTTAA 5040
TGTCGTTTCT CAGCAGCTGT TGGATCTGCG CCAGCAGGTT TCTGCCCTGA AGGCTTCCTC 5100
CCCTCCCAAT GCGGTTTAAA ACATAAATAA AAAACCAGAC TCTGTTTGA TTTGGATCAA 5160
GCAAGTGCTT TGCTGTCTTT ATTTAGGGGT TTTGCGCGCG CGGTAGGCCG GGGACCAGCG 5220
GTCTCGGTCTG TTGAGGTCC TGTGTATTTT TTCCAGGACG TGGTAAAGGT GACTCTGGAT 5280
GTTCAGATAC ATGGGCATAA GCCCGTCTCT GGGGTGGAGG TAGCACCCT GCAGAGCTTC 5340
ATGCTGCGGG GTGGTGTGT AGATGATCCA GTCCTAGCAG GAGCGCTGGG CGTGGTGCCT 5400



AAAAATGTCT TTCAGTAGCA AGCTGATTGC CAGGGGCAGG CCCTTGGTGT AAGTGTTTAC 5460
AAAGCGTTTA AGCTGGGATG GGTGCATACG TGGGGATATG AGATGCATCT TGGACTGTAT 5520
TTTTAGTTTG GGTATGTTCC CAGCCATATC CCTCCGGGGA TTCATGTTGT GCAGAACCAC 5580
CAGCAATATG TATCCGGTGC ACTTGGGAAA TTTGTCATGT AGCTTAGAAG GAAATGCGTG 5640
GAAGAACTTG GAGACGCCCT TGTGACCTCC AAGATTTTCC ATGCATTTCG CCATAATGAT 5700
GGCAATTTTG TATCGGCGG CGGCCTGGGC GAAGATATTT CTGGGATCAC TAACGTCATA 5760
GTTGTGTTTG AAGATGAGAT CGTCATAGGC CATTTTTACA AAGCGCGGGC GGAGGGTGCC 5820
AGACTCGTGT AATAATGGTC CATCCGGCCC AGGGGCGTAG TTACCCTCAC AGATTTGCAT 5880
TTCCCAGGTT TGAGTTTCAG ATGGGGGGAT CATGTCTACC TCGGGGCGA TGAAGAAAAC 5940
GGTTTCGTTG TTAGGGGAGA TCAGCTGGGA AGAAAGCAG TTCCTGAGCA GCTGCGACTT 6000
ACCGCAGGCG CTGGGRCCTT AAATCACACC TATTACCGGG TGCAACTGGT AGTTAAGAGA 6060
GCTGCAGCTG CCGTCATCCC TGAGCAGGGG GGCCACTTCG TTAAGCATGT CCCTGACTCG 6120
CATGTTTTCG CTGACCAATT CCGCCAGAAG GCGCTCGCG CCCAGCGATA GCAGTTCTTG 6180
CAAGGAAGCA AAGTTTTTCA ACGGTTTGAG ACCGTCGGCC GTAGGCATGC TTTTGAGCGT 6240
TTGACCAAGC AATTCCAGGC GGTCCACAG CTCGGTCACC TGCTCTACGG CATCTCGATC 6300
CAGCATATCT CCTCGTTTCG CGGGTTGCGG CGGCTTTCGC TGTACGGCAG TAGTCGGTGC 6360
TCGTCCAGAC GGGCCAGGGT CATGTCTTTC CACGGGCGCA GGGTCCTCGT CAGCGTAGTC 6420
TGGGTACCGG TGAAGGGGTG CGCTCCGGGC TGC CGCTGG CCAGGGTGCG CTTGAGGCTG 6480
GTCCTGCTGG TGCTGAAGCG CTGCCGTCT TCGCCCTGCG CGTCGGCCAG GTAGCATTTG 6540
ACCATGGTGT CATAGTCCAG CCCCTCCGCG GCGTGGCCCT TGGCGCGCAG CTTGCCCTTG 6600
GAGGAGCCGC CGCACGAGGG GCAGTGCAGA CTTTGTAGGG CGTAGAGCTT GGGCGCGAGA 6660
AATACCGATT CCGGGGAGTA GGCATCCGCG CCGCAGGCC CGCAGACGGT CTCGCATTCC 6720
ACGAGCCAGG TGAGCTCTGG CCGTTCGGGG TCAAAAACCA GGTTTCCCC ATGCTTTTTG 6780
ATGCGTTTCT TACCTCTGGT TTCCATGAGC CCGTGTCCAC GCTCGGTGAC GAAAAGGCTG 6840
TCCGTGTCCC CGTATACAGA CTTGAGAGGC CTGTCTCGA CCGATGCCCT TGAGAGCCTT 6900
CAACCCAGTC AGCTCCTTCC GGTGGGCGCG GGGCATGACT ATCGTCGCC CACTTATGAC 6960
TGTCTTCTTT ATCATGCAAC TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCTCTGGG TCATTTTCGG 7020
CGAGGACCGC TTTCGCTGGA GCGCGACGAT GATCGGCC TGCTTGCGG TATTCGGAAT 7080
CTTGACGCC CTCGCTCAAG CCTTCGTCAC TGGTCCCGCC ACCAAAAGTT TCGGCGAGAA 7140
GCAGGCCATT ATCGCCGGCA TGGCGGCCGA CGCGCTGGGC TACGTCTTGC TGGCGTTCGC 7200
GACGCGAGGC TGGATGGCCT TCCCATTAT GATTCTTCTC GCTTCCGGCG GCATCGGGAT 7260

GCCCCGTTG CAGGCCATGC TGTCCAGGCA GGTAGATGAC GACCATCAGG GACAGCTTCA 7320
AGGATCGCTC GCGGCTCTTA CCAGCCTAAC TTCGATCACT GGACCGCTGA TCGTCACGGC 7380
GATTTATGCC GCCTCGGCGA GCACATGGAA CGGGTTGGCA TGGATTGTAG GCGCCGCCCT 7440
ATACCTTGTC TGCCTCCCCG CGTTGCGTCG CGGTGCATGG AGCCGGGCCA CCTCGACCTG 7500
AATGGAAGCC GCGGGCACCT CGCTAACGGA TTCACCACTC CAAGAATTGG AGCCAATCAA 7560
TTCTTGCGGA GAACTGTGAA TGCGCAAACC AACCTTGGC AGAACATATC CATCGCGTCC 7620
GCCATCTCCA GCAGCCGCAC GCGGCGCATC TCGGGCAGCG TTGGGTCTCTG GCCACGGGTG 7680
CGCATGATCG TGCTCCTGTC GTTGAAGACC CGGCTAGGCT GCGGGGGTTG CCTTACTGGT 7740
TAGCAGAATG AATCACCGAT ACGCGAGCGA ACGTGAAGCG ACTGCTGCTG CAAAACGTCT 7800
GCGACCTGAG CAACAACATG AATGGTCTTC GGTTCCTGTTG TTTCGTAAAG TCTGGAAACG 7860
CGGAAGTCAG CGCCCTGCAC CATTATGTTT CGGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA 7920
CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA 7980
TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA 8040
GCCCCACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACCTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA 8100
CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGDATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG 8160
TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG 8220
TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG 8280
CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG 8340
AAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA 8400
CGAAAACCTA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT 8460
CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AACTTGGTC 8520
TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTGCTTC 8580
ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC 8640
TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC 8700
AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC 8760
CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAC TTAATAGTTF 8820
GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTGCAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC 8880
TTCATTCAGC TCCGGTTCCT AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA 8940
AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGT 9000
ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG 9060

[Handwritten signature]

CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TCGGGCGACC	9120
GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAACACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA	9180
AGTGCTCATC ATTGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT TACCGCTGTT	9240
GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTACTTT	9300
CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAT GCCGAAAAA AGGAATAAG	9360
GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA	9420
TCAGGCTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT	9480
AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT	9540
CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTTC AA	9592

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:4:

TAGTAAATTT GGGC

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla



(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:5:

AGTAAGATTT GGCC

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:6:

AGTGAAATCT GAAT

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: dupla

(D) TOPOLOGIA: desconhecida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:7:

GAATAATTT GTGT

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 14 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: desconhecida

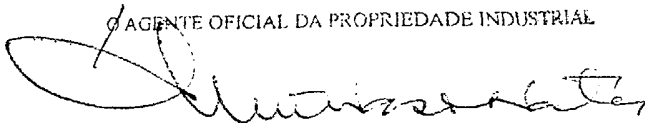
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:8:

CGTAATATTT GTCT

Lisboa, 30 de Abril de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL





REIVINDICAÇÕES

1. Vector viral recombinante compreendendo um gene de receptor de VLDL humano operacionalmente ligado a seqüências de regulação direccionando a sua expressão num hepatócito.
2. Vector de acordo com a reivindicação 1 em que o referido vector é um vector adenoviral.
3. Vector de acordo com a reivindicação 2 compreendendo ainda uma deleccão em todo ou numa porção do gene adenoviral E1.
4. Vector de acordo com a reivindicação 3 compreendendo ainda uma deleccão em todo ou numa porção do gene adenoviral E3.
5. Vector de acordo com a reivindicação 1, em que o referido vector é um vector viral adeno-associado.
6. Método para a distribuição *in vitro* de um gene de um receptor de VLDL num hepatócito compreendendo o passo de introduzir no referido hepatócito uma quantidade eficaz de um vector viral recombinante compreendendo um gene de receptor de VLDL humano operacionalmente ligado a seqüências de regulação que direccionam a sua expressão no referido hepatócito.
7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o referido vector é um vector adenoviral.
8. Método de acordo com a reivindicação 6, em que o referido vector é um vector viral adeno-associado.

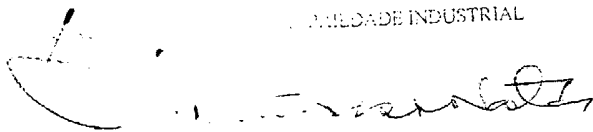


9. Hepatócito de mamífero que expressa um receptor de VLDL humano nele introduzido por transducção do referido hepatócito por um vector viral recombinante compreendendo um gene do receptor de VLDL humano operacionalmente ligado a sequências de regulação que direccionam a sua expressão no referido hepatócito.
10. Hepatócito de mamífero de acordo com a reivindicação 9, em que o referido vector é um vector adenoviral.
11. Hepatócito de mamífero de acordo com a reivindicação 9, em que o referido vector é um vector viral adeno-associado.
12. Composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e um vector viral, compreendendo o referido vector um gene de receptor de VLDL humano operacionalmente ligado a sequências de regulação que direccionam a sua expressão em hepatócitos.
13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12 em que o referido vector é um vector adenoviral.
14. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, em que o referido vector adenoviral compreende uma deleção em todo ou numa porção do gene adenoviral E1.
15. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13, em que o referido vector adenoviral compreende uma deleção em todo ou numa porção do gene adenoviral E3.
16. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12 em que o referido vector é um vector viral adeno-associado.

17. Utilização de um vector viral recombinante de acordo com quaisquer das reivindicações 1-5 no fabrico de um medicamento.

Lisboa, 30 de Abril de 2001

SOCIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, appearing to be "S. M. S. S.", written over the printed text "SOCIEDADE INDUSTRIAL".

Quarta

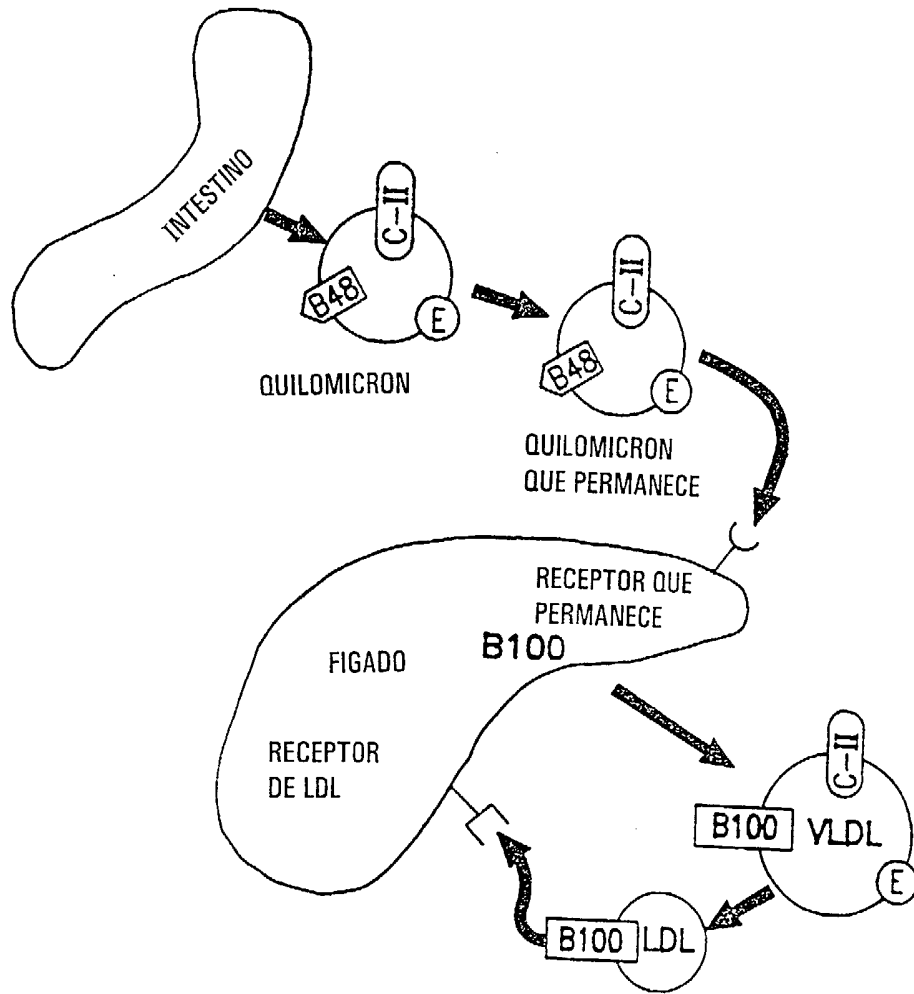


FIG. IA

Shuster

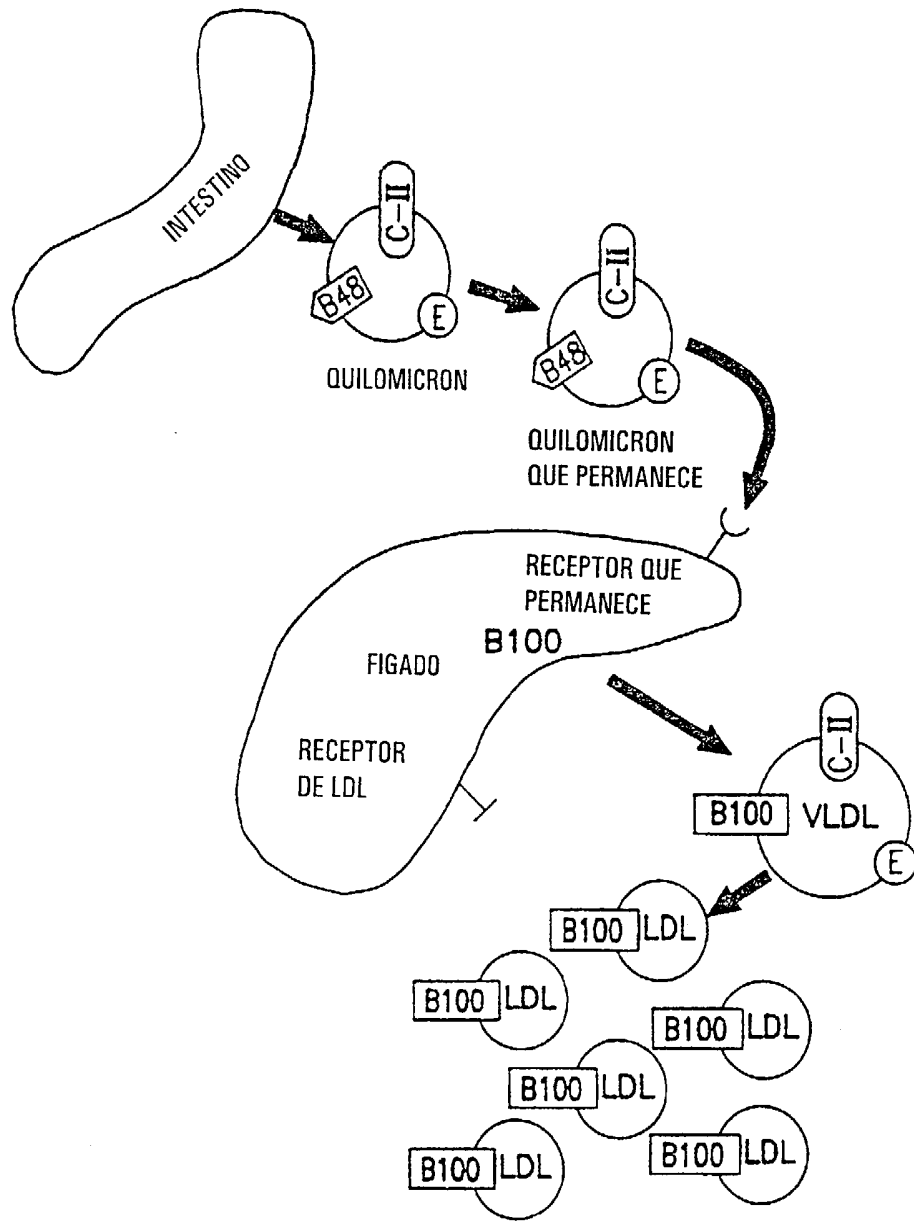


FIG. 1B

leaves

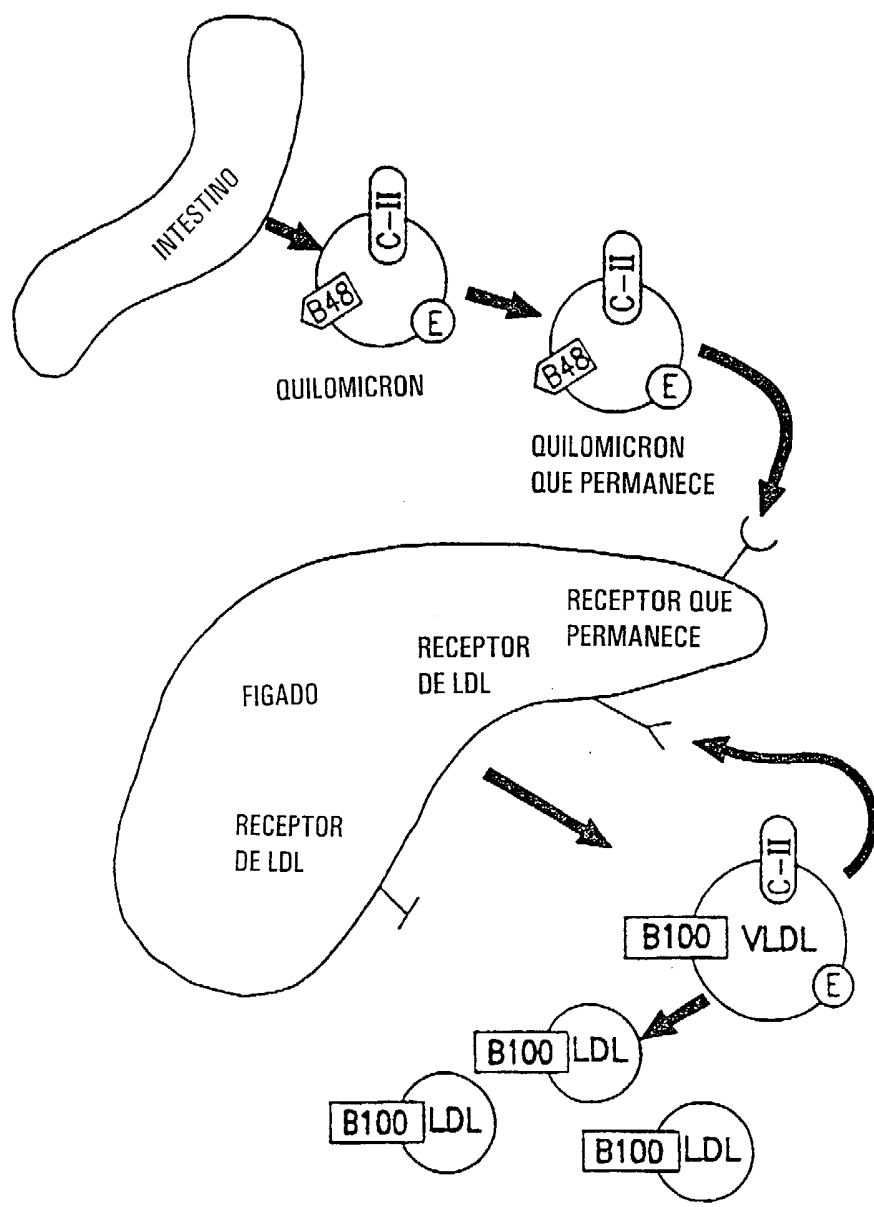


FIG. IC

Smith

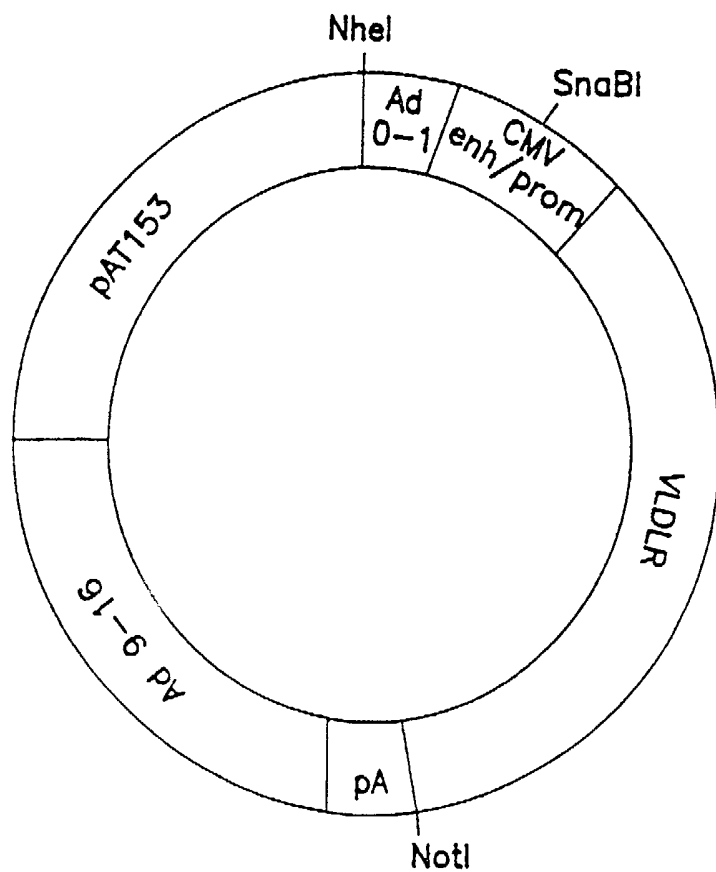


FIG. 2

Handwritten signature



FIG. 3

Lucas

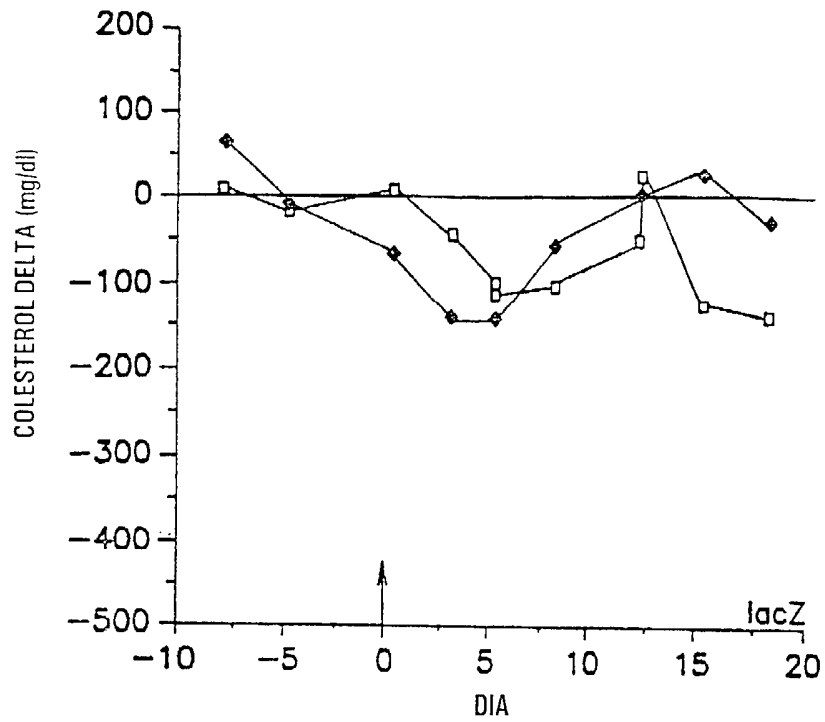


FIG. 4A

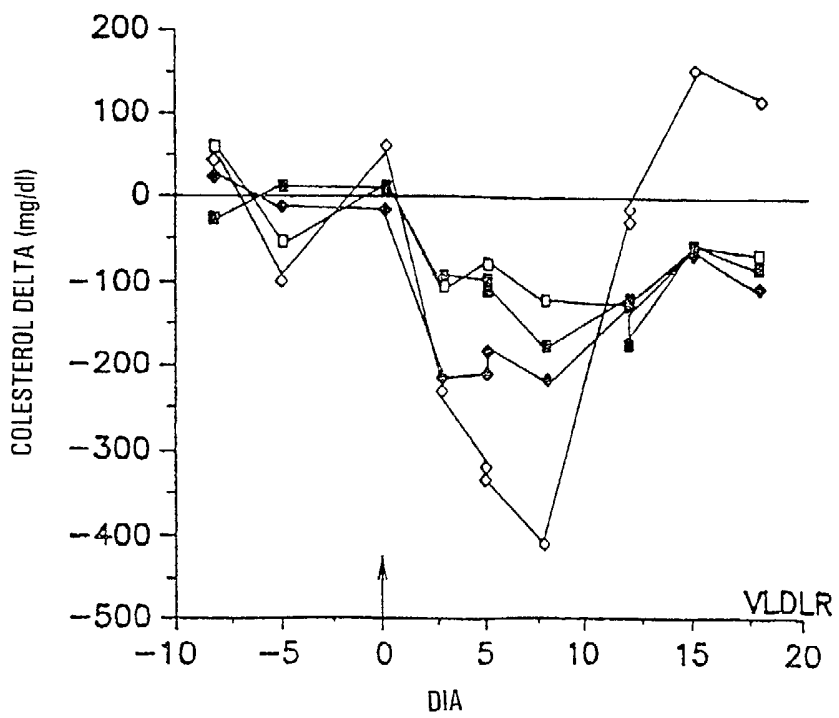


FIG. 4B

Almeida

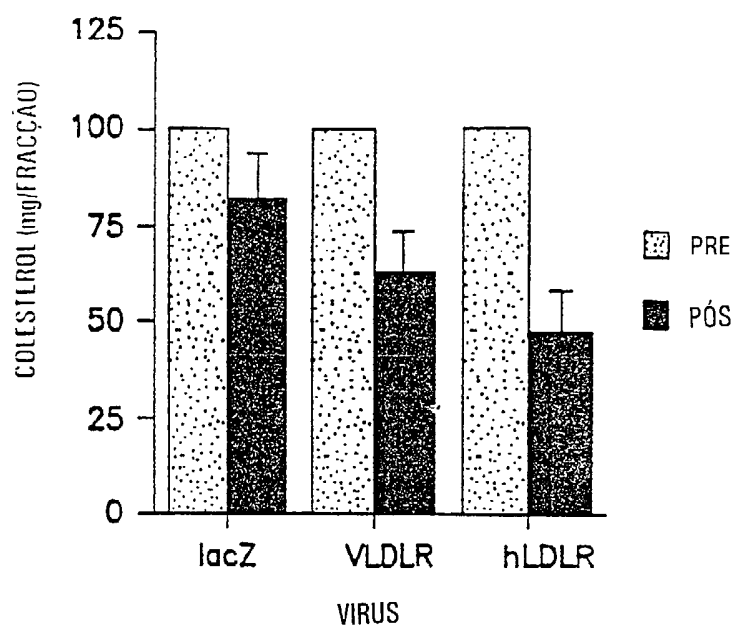


FIG. 5

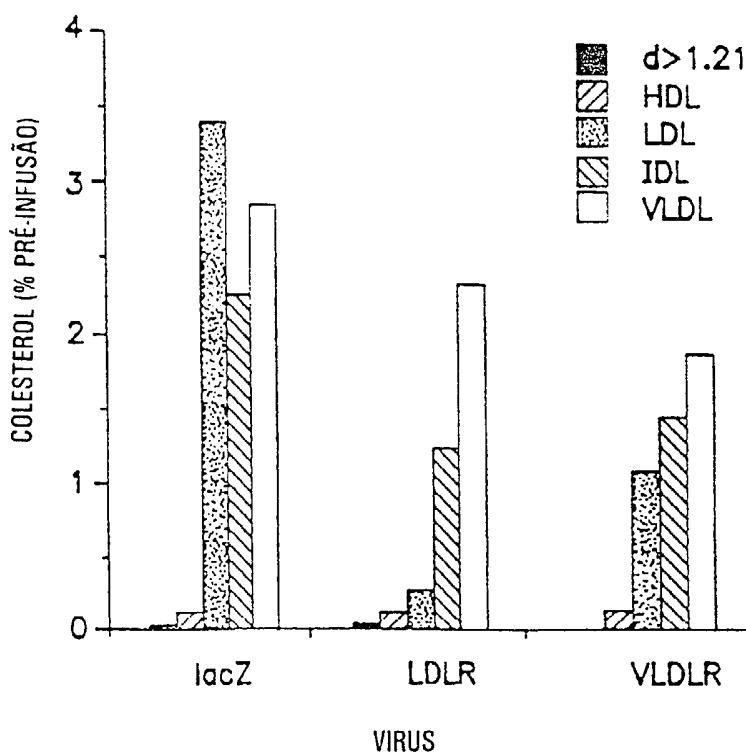


FIG. 6

Luigi

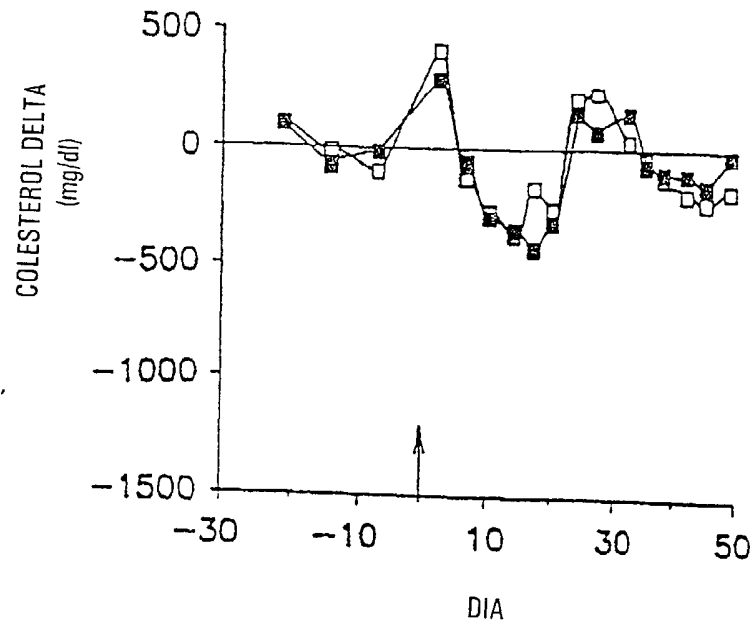


FIG. 7A

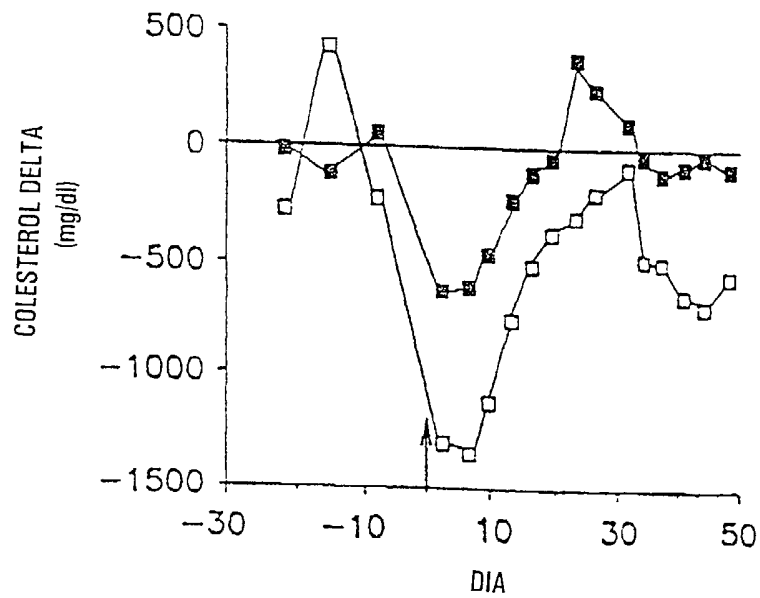


FIG. 7B

Handwritten signature

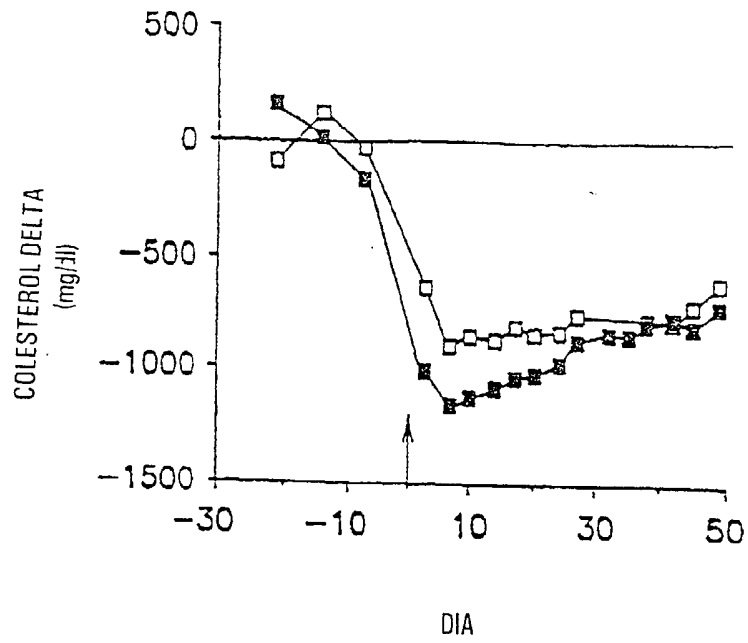


FIG. 7C

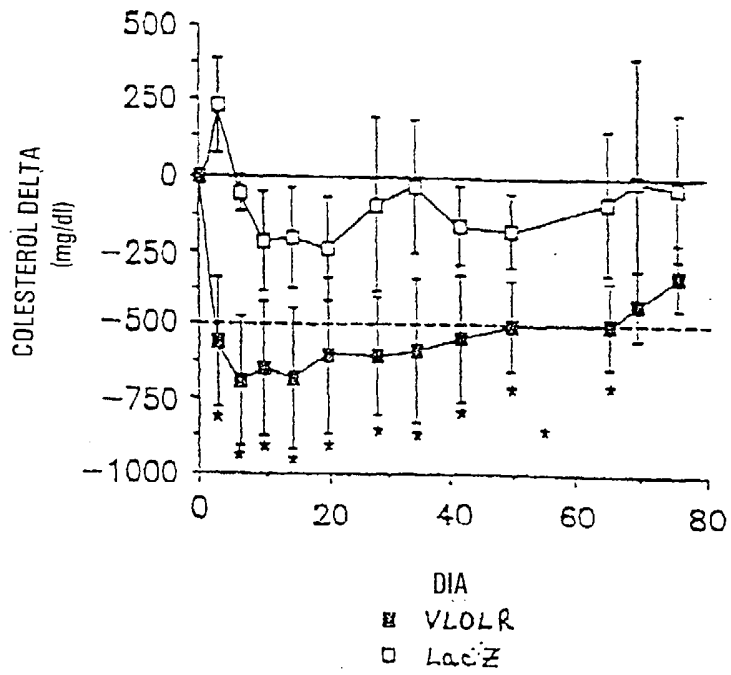


FIG. 7D

Handwritten signature

FIG. 8A

CTCTGCGGGC CGCGGGTGCG GGTCGTCGCT ACCGGCTCTC TCCGTTCTGT	50
GCTCTCTTCT GCTCTCGGCT CCCCACCCCC TCTCCCTTCC CTCCTCTCCC	100
CTTGCCCTCC CTCCTCTGCA GCGCCTGCAT TATTTTCTGC CCGCAGCTCG	150
GCTTGCACTG CTGCTGCAGC CCGGGGAGGT GGCTGGGTGG GTGGGGAGGA	200
GACTGTGCAA GTTGTAGGGG AGGGGGTGCC CTCTTCTTCC CCGCTCCCTT	250
CCCCAGCCAA GTGGTTCCCC TCCTTCTCCC CCTTTCCCCT CCCAGCCCCC	300
ACCTTCTTCC TCTTTGGAA GGGCTGGTAA CTTGTGCTGC GGAGCGAACG	350
GCGGCGGCGG CGGCGGCGGC GGCACCATCC AGGCGGGCAC C ATG GGC ACG	400
	Met Gly Thr
	1
TCC GCG CTC TGG GCC GTC TGG CTG CTG CTC GCG CTG TGC TGG	442
Ser Ala Leu Trp Ala Val Trp Leu Leu Leu Ala Leu Cys Trp	
5 10 15	
GCG CCC CGG GAG AGC GGC GCC ACC GGA ACC GGG AGA AAA GCC	484
Ala Pro Arg Glu Ser Gly Ala Thr Gly Thr Gly Arg Lys Ala	
20 25 30	
AAA TGT GAA CCC TCC CAA TTC CAG TGC ACA AAT GGT CGC TGT	526
Lys Cys Glu Pro Ser Gln Phe Gln Cys Thr Asn Gly Arg Cys	
35 40 45	
ATT ACG CTG TTG TGG AAA TGT GAT GGG GAT GAA GAC TGT GTT	568
Ile Thr Leu Leu Trp Lys Cys Asp Gly Asp Glu Asp Cys Val	
50 55	
GAC GGC AGT GAT GAA AAG AAC TGT GTA AAG AAG ACG TGT GCT	610
Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asn Cys Val Lys Lys Thr Cys Ala	
60 65 70	
GAA TCT GAC TTC GTG TGC AAC AAT GGC CAG TGT GTT CCC AGC	652
Glu Ser Asp Phe Val Cys Asn Asn Gly Gln Cys Val Pro Ser	
75 80 85	
CGA TGG AAG TGT GAT GGA GAT CCT GAC TGC GAA GAT GGT TCA	694
Arg Trp Lys Cys Asp Gly Asp Pro Asp Cys Glu Asp Gly Ser	
90 95 100	
GAT GAA AGC CCA GAA CAG TGC CAT ATG AGA ACA TGC CGC ATA	736
Asp Glu Ser Pro Glu Gln Cys His Met Arg Thr Cys Arg Ile	
105 110 115	
CAT GAA ATC AGC TGT GGC GCC CAT TCT ACT CAG TGT ATC CCA	778
His Glu Ile Ser Cys Gly Ala His Ser Thr Gln Cys Ile Pro	
120 125	

Labes

FIG. 8B

GTG	TCC	TGG	AGA	TGT	GAT	GGT	GAA	AAT	GAT	TGT	GAC	AGT	GGA	820
Val	Ser	Trp	Arg	Cys	Asp	Gly	Glu	Asn	Asp	Cys	Asp	Ser	Gly	
130					135					140				
GAA	GAT	GAA	GAA	AAC	TGT	GGC	AAT	ATA	ACA	TGT	AGT	CCC	GAC	862
Glu	Asp	Glu	Glu	Asn	Cys	Gly	Asn	Ile	Thr	Cys	Ser	Pro	Asp	
	145					150					155			
GAG	TTC	ACC	TGC	TCC	AGT	GGC	CGC	TGC	ATC	TCC	AGG	AAC	TTT	904
Glu	Phe	Thr	Cys	Ser	Ser	Gly	Arg	Cys	Ile	Ser	Arg	Asn	Phe	
		160					165					170		
GTA	TGC	AAT	GGC	CAG	GAT	GAC	TGC	AGC	GAT	GGC	AGT	GAT	GAG	946
Val	Cys	Asn	Gly	Gln	Asp	Asp	Cys	Ser	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	
			175					180					185	
CTG	GAC	TGT	GCC	CCG	CCA	ACC	TGT	GGC	GCC	CAT	GAG	TTC	CAG	988
Leu	Asp	Cys	Ala	Pro	Pro	Thr	Cys	Gly	Ala	His	Glu	Phe	Gln	
				190					195					
TGC	AGC	ACC	TCC	TCC	TGC	ATC	CCC	ATC	AGC	TGG	GTA	TGC	GAC	1030
Cys	Ser	Thr	Ser	Ser	Cys	Ile	Pro	Ile	Ser	Trp	Val	Cys	Asp	
200					205					210				
GAT	GAT	GCA	GAC	TGC	TCC	GAC	CAA	TCT	GAT	GAG	TCC	CTG	GAG	1072
Asp	Asp	Ala	Asp	Cys	Ser	Asp	Gln	Ser	Asp	Glu	Ser	Leu	Glu	
	215					220					225			
CAG	TGT	GGC	CGT	CAG	CCA	GTC	ATA	CAC	ACC	AAG	TGT	CCA	GCC	1114
Gln	Cys	Gly	Arg	Gln	Pro	Val	Ile	His	Thr	Lys	Cys	Pro	Ala	
		230					235					240		
AGC	GAA	ATC	CAG	TGC	GGC	TCT	GGC	GAG	TGC	ATC	CAT	AAG	AAG	1156
Ser	Glu	Ile	Gln	Cys	Gly	Ser	Gly	Glu	Cys	Ile	His	Lys	Lys	
			245					250					255	
TGG	CGA	TGT	GAT	GGG	GAC	CCT	GAC	TGC	AAG	GAT	GGC	AGT	GAT	1198
Trp	Arg	Cys	Asp	Gly	Asp	Pro	Asp	Cys	Lys	Asp	Gly	Ser	Asp	
				260					265					
GAG	GTC	AAC	TGT	CCC	TCT	CGA	ACT	TGC	CGA	CCT	GAC	CAA	TTT	1240
Glu	Val	Asn	Cys	Pro	Ser	Arg	Thr	Cys	Arg	Pro	Asp	Gln	Phe	
270					275					280				
GAA	TGT	GAG	GAT	GGC	ACC	TGC	ATC	CAT	GGC	AGC	AGG	CAG	TGT	1282
Glu	Cys	Glu	Asp	Gly	Ser	Cys	Ile	His	Gly	Ser	Arg	Gln	Cys	
	285					290					295			
AAT	GGT	ATC	CGA	GAC	TGT	GTC	GAT	GGT	TCC	GAT	GAA	GTC	AAC	1324
Asn	Gly	Ile	Arg	Asp	Cys	Val	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Val	Asn	
			300				305					310		

Clute

FIG. 8C

TGC AAA AAT GTC AAT CAG TGC TTG GGC CCT GGA AAA TTC AAG Cys Lys Asn Val Asn Gln Cys Leu Gly Pro Gly Lys Phe Lys 315 320 325	1366
TGC AGA AGT GGA GAA TGC ATA GAT ATC AGC AAA GTA TGT AAC Cys Arg Ser Gly Glu Cys Ile Asp Ile Ser Lys Val Cys Asn 330 335	1408
CAG GAG CAG GAC TGC AGG GAC TGG AGT GAT GAG CCC CTG AAA Gln Glu Gln Asp Cys Arg Asp Trp Ser Asp Glu Pro Leu Lys 340 345 350	1450
GAG TGT CAT ATA AAC GAA TGC TTG GTA AAT AAT GGT GGA TGT Glu Cys His Ile Asn Glu Cys Leu Val Asn Asn Gly Gly Cys 355 360 365	1492
TCT CAT ATC TGC AAA GAC CTA GTT ATA GGC TAC GAG TGT GAC Ser His Ile Cys Lys Asp Leu Val Ile Gly Tyr Glu Cys Asp 370 375 380	1534
TGT GCA GCT GGG TTT GAA CTG ATA GAT AGG AAA ACC TGT GGA Cys Ala Ala Gly Phe Glu Leu Ile Asp Arg Lys Thr Cys Gly 385 390 395	1576
GAT ATT GAT GAA TGC CAA AAT CCA GGA ATC TGC AGT CAA ATT Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asn Pro Gly Ile Cys Ser Gln Ile 400 405	1618
TGT ATC AAC TTA AAA GGC GGT TAC AAG TGT GAA TGT AGT CGT Cys Ile Asn Leu Lys Gly Gly Tyr Lys Cys Glu Cys Ser Arg 410 415 420	1660
GCC TAT CAA ATG GAT CTT GCT ACT GGC GTG TGC AAG GCA GTA Ala Tyr Gln Met Asp Leu Ala Thr Gly Val Cys Lys Ala Val 425 430 435	1702
GGC AAA GAG CCA AGT CTG ATC TTC ACT AAT CGA AGA GAC ATC Gly Lys Glu Pro Ser Leu Ile Phe Thr Asn Arg Arg Asp Ile 440 445 450	1744
AGG AAG ATT GGC TTA GAG AGG AAA GAA TAT ATC CAA CTA GTT Arg Lys Ile Gly Leu Glu Arg Lys Glu Tyr Ile Gln Leu Val 455 460 465	1786
GAA CAG CTA AGA AAC ACT GTG GCT CTC GAT GCT GAC ATT GCT Glu Gln Leu Arg Asn Thr Val Ala Leu Asp Ala Asp Ile Ala 470 475	1828
GCC CAG AAA CTA TTC TGG GCC GAT CTA AGC CAA AAG GCT ATC Ala Gln Lys Leu Phe Trp Ala Asp Leu Ser Gln Lys Ala Ile 480 485 490	1870

FIG. 8D

TTC	AGT	GCC	TCA	ATT	GAT	GAC	AAG	GTT	GGT	AGA	CAT	GTT	AAA	1912
Phe	Ser	Ala	Ser	Ile	Asp	Asp	Lys	Val	Gly	Arg	His	Val	Lys	
	495					500					505			
ATG	ATC	GAC	AAT	GTC	TAT	AAT	CCT	GCA	GCC	ATT	GCT	GTT	GAT	1954
Met	Ile	Asp	Asn	Val	Tyr	Asn	Pro	Ala	Ala	Ile	Ala	Val	Asp	
		510					515					520		
TGG	GTG	TAC	AAG	ACC	ATC	TAC	TGG	ACT	GAT	GCG	GCT	TCT	AAG	1996
Trp	Val	Tyr	Lys	Thr	Ile	Tyr	Trp	Thr	Asp	Ala	Ala	Ser	Lys	
			525					530					535	
ACT	ATT	TCA	GTA	GCT	ACC	CTA	GAT	GGA	ACC	AAG	AGG	AAG	TTC	2038
Thr	Ile	Ser	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Gly	Thr	Lys	Arg	Lys	Phe	
				540					545					
CTG	TTT	AAC	TCT	GAC	TTG	CGA	GAG	CCT	GCC	TCC	ATA	GCT	GTG	2080
Leu	Phe	Asn	Ser	Asp	Leu	Arg	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Val	
550					555					560				
GAC	CCA	CTG	TCT	GGC	TTT	GTT	TAC	TGG	TCA	GAC	TGG	GGT	GAA	2122
Asp	Pro	Leu	Ser	Gly	Phe	Val	Tyr	Trp	Ser	Asp	Trp	Gly	Glu	
	565					570					575			
CCA	GCT	AAA	ATA	GAA	AAA	GCA	GGA	ATG	AAT	GGA	TTC	GAT	AGA	2164
Pro	Ala	Lys	Ile	Glu	Lys	Ala	Gly	Met	Asn	Gly	Phe	Asp	Arg	
		580					585					590		
CGT	CCA	CTG	GTG	ACA	GCG	GAT	ATC	CAG	TGG	CCT	AAC	GGA	ATT	2206
Arg	Pro	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	Ile	Gln	Trp	Pro	Asn	Gly	Ile	
			595					600					605	
ACA	CTT	GAC	CTT	ATA	AAA	AGT	CGC	CTC	TAT	TGG	CTT	GAT	TCT	2248
Thr	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Tyr	Trp	Leu	Asp	Ser	
				610					615					
AAG	TTG	CAC	ATG	TTA	TCC	AGC	GTG	GAC	TTG	AAT	GGC	CAA	GAT	2290
Lys	Leu	His	Met	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Leu	Asn	Gly	Gln	Asp	
620					625					630				
CGT	AGG	ATA	GTA	CTA	AAG	TCT	CTG	GAG	TTC	CTA	GCT	CAT	CCT	2332
Arg	Arg	Ile	Val	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Phe	Leu	Ala	His	Pro	
	635					640					645			
CTT	GCA	CTA	ACA	ATA	TTT	GAG	GAT	CGT	GTC	TAC	TGG	ATA	GAT	2374
Leu	Ala	Leu	Thr	Ile	Phe	Glu	Asp	Arg	Val	Tyr	Trp	Ile	Asp	
		650					655					660		
GGG	GAA	AAT	GAA	GCA	GTC	TAT	GGT	GCC	AAT	AAA	TTC	ACT	GGA	2416
Gly	Glu	Asn	Glu	Ala	Val	Tyr	Gly	Ala	Asn	Lys	Phe	Thr	Gly	
			665					670					675	

Handwritten signature

FIG. 8F

CAC ACG TAC CCA GCA ATA TCA GTT GTA AGC ACA GAT GAT GAT	3004
His Thr Tyr Pro Ala Ile Ser Val Val Ser Thr Asp Asp Asp	
860 865 870	
CTA GCT TGACTTCTGT GACAAATGTT GACCTTTGAG GTCTAAACAA	3050
Leu Ala	
ATAATACCCC CGTCGGAATG GTAACCGAGC CAGCAGCTGA AGTCTCTTTT	3100
TCTTCCTCTC GGCTGGAAGA ACATCAAGAT ACCTTTGCGT GGATCAAGCT	3150
TGCTGTA CTTT GACCGTTTTT ATATTACTTT TGTAATATT CTTGTCCACA	3200
TTCTACTTCA GCTTTGGATG TGTTACCGA GTATCTGTAA CCCTTGAATT	3250
TCTAGACAGT ATTGCCACCT CTGGCCAAAT ATGCACTTTC CCTAGAAAGC	3300
CATATTCCAG CAGTGAAACT TGTGCTATAG TGTATACCAC CTGTACATAC	3350
ATTGTATAGG CCATCTGTAA ATATCCAGA GAACAATCAC TATTCTTAAG	3400
CACTTTGAAA ATATTTCTAT GTAAATTATT GTAAACTTTT TCAATGGTTG	3450
GGACAATGGC AATAGGACAA AACGGTTAC TAAGATGAAA TTGCCAAAAA	3500
AATTTATAAA CTAATTTTGG TACGTATGAA TGATATCTTT GACCTCAATG	3550
GAGGTTTGCA AAGACTGAGT GTTCAAATA CTGTACATTT TTTTCAAGT	3600
GCTAAAAAAT TAAACCAAGC AGCTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	3650
AAAAAA	3656

Lucas

FIG. 9A

GAATTCGCTA GCATCATCAA TAATATACCT TATTTTGGAT TGAAGCCAAT ATGATAATGA
60
GGGGGTGGAG TTTGTGACGT GCGCGGGGC GTGGGAACGG GCGGGGTGAC GTAGTAGTGT
120
GGCGGAAGTG TGATGTTGCA AGTGTGGCGG AACACATGTA AGCGACGGAT GTGGCAAAG
180
TGACGTTTTT GGTGTGCGCC GGTGTACACA GGAAGTGACA ATTTTCGCGC GGTTTTAGGC
240
GGATGTTGTA GTAAATTTGG GCGTAACCGA GTAAGATTTG GCCATTTTCG CGGGAAAAC
300
GAATAAGAGG AAGTGAAATC TGAATAATTT TGTGTTACTC ATAGCGCGTA ATATTTGTCT
360
AGGGAGATCA GCCTGCAGST CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCCGC TGGCTGACCG
420
CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA
480
GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AACTGCCCCA CTTGGCAGTA
540
CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC
600
GCCTGGCATT ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTIONGCA GTACATCTAC
660
GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGG
720
TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG
780
TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACC
840
CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT
900
AGAGAACCCA CTGCTTAACT GGCTTATCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGAGACCCA
960
AGCTTCTCTG CGGGCCGCGG GTGCGGGTCTG TCGCTACCGG CTCTCTCCGT TCTGTGCTCT
1020
CTTCTGCTCT CGGCTCCCCA CCCCTCTCC CTCCCTCCT CTCCCCTTGC CTCCCCTCCT
1080

Quatt

FIG. 9B

CTGCAGCGCC TGCATTATTT TCTGCCCGCA GCTCGGCTTG CACTGCTGCT GCAGCCCGGG
1140

GAGGTGGCTG GGTGGGTGGG GAGGAGAC1G TGCAAGTTGT AGGGGAGGGG GTGCCCTCTT
1200

CTTCCCCGCT CCTTCCCCA GCCAAGTGGT TCCCCCTCTT CTCCCCCTTT CCCCCTCCAG
1260

CCCCCACCTT CTTCTCTTT CGGAAGGGCT GGTAACCTGT CGTGCGGAGC GAACGGCGGC
1320

GGCGGCGGCG GCGGCGGCAC CATCCAGGCG GGCACCATGG GCACGTCCGC GCTCTGGGCC
1380

GTCTGGCTGC TGCTCGCGCT GTGCTGGGCG CCCCAGGAGA GCGGCGCCAC CGGAACCGGG
1440

AGAAAAGCCA AATGTGAACC CTCCCAATTC CAGTGCACAA ATGGTCGCTG TATTACGCTG
1500

TTGTGGAAAT GTGATGGGGA TGAAGACTGT GTTGACGGCA GTGATGAAAA GAACTGTGTA
1560

AAGAAGACGT GTGCTGAATC TGACTTCGTG TGCAACAATG GCCAGTGTGT TCCCAGCCGA
1620

TGGAAGTGTG ATGGAGATCC TGACTGCGAA GATGGTTCAG ATGAAAGCCC AGAACAGTGC
1680

CATATGAGAA CATGCCGCAT ACATGAAATC AGCTGTGGCG CCCATTCTAC TCAGTGTATC
1740

CCAGTGTCTT GGAGATGTGA TGGTGGAAAT GATTGTGACA GTGGAGAAGA TGAAGAAAAC
1800

TGTGGCAATA TAACATGTAG TCCCGACGAG TTCACCTGCT CCAGTGGCCG CTGCATCTCC
1860

AGGAACTTTG TATGCAATGG CCAGGATGAC TGCAGCGATG GCAGTGATGA GCTGGACTGT
1920

GCCCCGCCAA CCTGTGGGCG CCATGAGTTC CAGTGCAGCA CCTCCTCCTG CATCCCCATC
1980

AGCTGGGTAT GCGACGATGA TGCACACTGC TCCGACCAAT CTGATGAGTC CCTGGAGCAG
2040

TGTGGCCGTC AGCCAGTCAT ACACACCAAG TGTCCAGCCA GCGAAATCCA GTGCGGCTCT
2100

GGCGAGTGCA TCCATAAGAA GTGGCGATGT GATGGGGACC CTGACTGCAA GGATGGCAGT
2160

Quinn

FIG. 9C

GATGAGGTCA ACTGTCCCTC TCGAACTTGC CGACCTGACC AATTTGAATG TGAGGATGGC
2220

AGCTGCATCC ATGGCAGCAG GCAGTGTAAT GGTATCCGAG ACTGTGTCGA TGGTTCCGAT
2280

GAAGTCAACT GCAAAAATGT CAATCAGTGC TTGGGCCCTG GAAAATTCAA GTGCAGAAGT
2340

GGAGAATGCA TAGATATCAG CAAAGTATGT AACCAGGAGC AGGACTGCAG GGACTGGAGT
2400

GATGAGCCCC TGAAAGAGTG TCATATAAAC GAATGCTTGG TAAATAATGG TGGATGTTCT
2460

CATATCTGCA AAGACCTAGT TATAGGCTAC GAGTGTGACT GTGCAGCTGG GTTTGAACTG
2520

ATAGATAGGA AAACCTGTGG AGATATTGAT GAATGCCAAA ATCCAGGAAT CTGCAGTCAA
2580

ATTTGTATCA ACTTAAAAGG CCGTTACAAG TGTGAATGTA GTCGTGCCTA TCAAATGGAT
2640

CTTGCTACTG GCGTGTGCAA GGCAGTAGGC AAAGAGCCAA GTCTGATCTT CACTAATCGA
2700

AGAGACATCA GGAAGATTGG CTTAGAGAGG AAAGAATATA TCCAACCTAGT TGAACAGCTA
2760

AGAAACACTG TGGCTCTCGA TGCTGACATT GCTGCCCAGA AACTATTCTG GGCCGATCTA
2820

AGCCAAAAGG CTATCTTCAG TGCCTCAATT GATGACAAGG TTGGTAGACA TGTTAAAATG
2880

ATCGACAATG TCTATAATCC TGCAGCCATT GCTGTTGATT GGGTGTACAA GACCATCTAC
2940

TGGACTGATG CGGCTTCTAA GACTATTTCA GTAGCTACCC TAGATGGAAC CAAGAGGAAG
3000

TTCCTGTTTA ACTCTGACTT GCGAGAGCCT GCCTCCATAG CTGTGGACCC ACTGTCTGGC
3060

TTTGTMTACT GGTCACTG GGGTGAACCA GCTAAAATAG AAAAAGCAGG AATGAATGGA
3120

TTCGATAGAC GTCCACTGGT GACAGCGGAT ATCCAGTGGC CTAACGGAAT TACACTTGAC
3180

CTTATAAAAA GTCGCCTCTA TTGGCTTGAT TCTAAGTTGC ACATGTTATC CAGCGTGGAC
3240

lectal

FIG. 9D

TTGAATGGCC AAGATCGTAG GATAGTACTA AAGTCTCTGG AGTTCCTAGC TCATCCTCTT
3300

GCACTAACAA TATTTGAGGA TCGTGTCTAC TGGATAGATG GGGAAAATGA AGCAGTCTAT
3360

GGTGCCAATA AATTCACTGG ATCAGAGCAT GCCACTCTAG TCAACAACCT GAATGATGCC
3420

CAAGACATCA TTGTCTATCA TGAACCTGTA CAGCCATCAG GTAAAAATTG GTGTGAAGAA
3480

GACATGGAGA ATGGAGGATG TGAATACCTA TGCCTGCCAG CACCACAGAT TAATGATCAC
3540

TCTCCAAAAT ATACCTGTTC CTGTCCCAGT GGGTACAATG TAGAGGAAAA TGGCCGAGAC
3600

TGTCAAAGTA CTGCAACTAC TGTGACTTAG AGACAAAAGA TACGAACACA ACAGAAATTT
3660

CAGCAACTAG TGGACTAGTT CCTGGAGGGA TCAATGTGAC CACAGCAGTA TCAGAGGTCA
3720

GTGTTCCCCC AAAAGGGACT TCTGCCGCAT GGGCCATTCT TCCTCTCTTG CTCTTAGTGA
3780

TGGCAGCAGT AGGTGGCTAC TTGATGTGGC GGAATTGGCA ACACAAGAAC ATGAAAAGCA
3840

TGAACTTTGA CAATCCTGTG TACTTGAAAA CCACTGAAGA GGACCTCTCC ATAGACATTG
3900

GTAGACACAG TGCTTCTGTT GGACACACGT ACCCAGCAAT ATCAGTTGTA AGCACAGATG
3960

ATGATCTAGC TTGACTTCTG TGACAAATGT TGACCTTTGA GGTCTAAACA AATAATACCC
4020

CCGTCCGAAT GGTAACCGAG CCAGCAGCTG AAGTCTCTTT TTCTTCCTCT CGGCTGGAAG
4080

AACATCAAGA TACCTTTGCG TGGATCAAGC TTGGTACCGA GCTCGGATCC ACTAGTAACG
4140

GCCGCCAGTG TGCTGGAATT CTGCAGATAT CCATCACACT GCGGCCGCG GGGATCCAGA
4200

CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACCT AGAATGCAGT GAAAAAATG
4260

CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA
4320

Alu

FIG. 9E

ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCATTT TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA
4380
GGTTTTTTCG GATCCTCTAG AGTCGACCTG CAGGCTGATC TGGAAGGTGC TGAGGTACGA
4440
TGAGACCCGC ACCAGGTGCA GACCCTGCGA GTGTGGCGGT AAACATATTA GGAACCAGCC
4500
TGTGATGCTG GATGTGACCG AGGAGCTGAG GCCCGATCAC TTGGTGCTGG CCTGCACCCG
4560
CGCTGAGTTT GGCTCTAGCG ATGAAGATAC AGATTGAGGT ACTGAAATGT GTGGGCGTGG
4620
CTTAAGGGTG GGAAAGAATA TATAAGGTGG GGGTCTTATG TAGTTTTGTA TCTGTTTTGC
4680
AGCAGCCGCC GCCGCCATGA GCACCAACTC GTTTGATGGA AGCATTGTGA GCTCATATTT
4740
GACAACCGCG ATGCCCCAT GGGCCGGGGT GCGTCAGAAT GTGATGGGCT CCAGCATTGA
4800
TGGTGCCCCG GTCCTGCCCC CAAACTCTAC TACCTTGACC TACGAGACCG TGTCTGGAAC
4860
GCCGTTGGAG ACTGCAGCCT CCGCCGCCGC TTCAGCCGCT GCAGCCACCG CCCGCGGGAT
4920
TGTGACTGAC TTTGCTTTCC TGAGCCCGCT TGCAAGCAGT GCAGCTTCCC GTTCATCCGC
4980
CCGCGATGAC AAGTTGACGG CTCTTTTGGC ACAATTGGAT TCTTTGACCC GGGAACTTAA
5040
TGTGTTTTCT CAGCAGCTGT TGGATCTGCG CCAGCAGGTT TCTGCCCTGA AGGCTTCCTC
5100
CCCTCCCAAT GCGGTTTAAA ACATAAATAA AAAACCAGAC TCTGTTTGA TTTGGATCAA
5160
GCAAGTGTCT TGCTGTCTTT ATTTAGGGGT TTTGCGCGCG CGGTAGGCCC GGGACCAGCG
5220
GTCTCGGTG TTAGGGTCC TGTGTATTTT TTCCAGGACG TGGTAAAGGT GACTCTGGAT
5280
GTTGAGATAC ATGGGCATAA GCCCGTCTCT GGGGTGGAGG TAGCACCCT GCAGAGCTTC
5340
ATGCTGCGGG GTGGTGTGT AGATGATCCA GTCGTAGCAG GAGCGCTGGG CGTGGTGCCT
5400

FIG. 9F

AAAAATGTCT TTCAGTAGCA AGCTGATTGC CAGGGGCAGG CCCTTGGTGT AACTGTTTAC
5460

AAAGCGTTA AGCTGGGATG GGTGCATACG TGGGGATATG AGATGCATCT TGGACTGTAT
5520

TTTTAGGTTG GCTATGTTCC CAGCLATATC CCTCCGGGGA TTCATGTTGT GCAGAACCAC
5580

CAGCACAGTG TA1CCGGTGC ACTTGGGAAA TTTGTCATGT AGCTTAGAAG GAAATGCGTG
5640

GAAGAACTTG GAGACGCCCT TGTGACCTCC AAGATTTTCC ATGCATTCGT CCATAATGAT
5700

GGCAATGGGC CCACGGGCGG CGGCCTGGGC GAAGATATTT CTGGGATCAC TAACGTCATA
5760

GTTGTGTTCC AGGATGAGAT CGTCATAGGC CATTTTTACA AAGCGCGGGC GGAGGGTGCC
5820

AGACTGCGGT ATAATGGTTC CATCCGGCCC AGGGGCGTAG TTACCCTCAC AGATTTGCAT
5880

TTCCCACGCT TTGAGTTCAG ATGGGGGGAT CATGTCTACC TCGGGGGCGA TGAAGAAAAC
5940

GGTTTCCGGG GTAGGGGAGA TCAGCTGGGA AGAAAGCAGG TTCCTGAGCA GCTGCGACTT
6000

ACCGCAGCCG GTGGGCCCGT AAATCACACC TATTACCGGG TGCAACTGGT AGTTAAGAGA
6060

GCTGCAGCTG CCGTCATCCC TGAGCAGGGG GGCCACTTCG TTAAGCATGT CCCTGACTCG
6120

CATGTTTTCC CTGACCAAAT CCGCCAGAAG GCGCTCGCCG CCCAGCGATA GCAGTTCTTG
6180

CAAGGAAGCA AAGTTTTTCA ACGGTTTGAG ACCGTCCGCC GTAGGCATGC TTTTGAGCGT
6240

TTGACCAAGC AGTTCAGGC GGTCCCACAG CTCGGTCACC TGCTCTACGG CATCTCGATC
6300

CAGCATATCT CCTCGTTTCG CGGGTTGGGG CGGCTTTTCG TGTACGGCAG TAGTCGGTGC
6360

TCGTCCAGAC GGGCCAGGGT CATGTCTTTC CACGGGCGCA GGGTCCTCST CAGCGTAGTC
6420

TGGGTACCG TGAAGGGGTG CGCTCCGGGC TCGCGCTGG CCAGGGTGCG CTTGAGGCTG
6480

FIG. 9G

GTCCTGCTGG TGCTGAAGCG CTGCCGGTCT TCGCCCTGCG CGTCGGCCAG GTAGCATTTG 6540

ACCATGGTGT CATAGTCCAG CCCCTCCGCG GCGTGGCCCT TGGCGCGCAG CTTGCCCTTG 6600

GAGGAGGCGC CGCACGAGGG GCAGTGCAGA CTTTTGAGGG CGTAGAGCTT GGGCGCGAGA 6660

AATACCGATT CCGGGGAGTA GGCATCCGCG CCGCAGGCC CGCAGACGGT CTCGCATTCC 6720

ACGAGCCAGG TGAGCTCTGG CCGTTCGGGG TCAAAAACCA GTTTCCCCC ATGCTTTTTG 6780

ATGCGTTTCT TACCTCTGGT TTCCATGAGC CCGTGTCCAC GCTCGGTGAC GAAAAGGCTG 6840

TCCGTGTCCC CGTATACAGA CTTGAGAGGC CTGTCCCTGA CCGATGCCCT TGAGAGCCTT 6900

CAACCCAGTC AGCTCCTTCC GGTGGGCGCG GGGCATGACT ATCGTCGCCG CACTTATGAC 6960

TGTCCTCTTT ATCATGCAAC TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCTCTGGG TCATTTTCGG 7020

CGAGGACCGC TTTCGCTGGA GCGCGACGAT GATCGGCCTG TCGCTTGGCG TATTCGGAAT 7080

CTTGACAGCC CTCGCTCAAG CCTTCGTAC TGGTCCCGCC ACCAAACGTT TCGGCGAGAA 7140

GCAGGCCATT ATCGCCGGCA TGGCGGCCGA CCGCTGGGC TACGTCTTGC TGGCGTTCCG 7200

GACGCGAGGC TGGATGGCCT TCCCCATTAT GATTCTTCTC GCTTCCGGCG GCATCGGGAT 7260

GCCCCGTTG CAGGCCATGC TGTCCAGGCA GGTAGATGAC GACCATCAGG GACAGCTTCA 7320

AGGATCGCTC GCGGCTCTTA CCAGCCTAAC TTCGATCACT GGACCGCTGA TCGTCACGGC 7380

GATTTATGCC GCCTCGGCGA GCACATGGAA CGGGTGGCA TGGATTGTAG GCGCCGCCCT 7440

ATACCTTGTG TGCCTCCCCG CGTTCGTCG CCGTGCATGG AGCCGGGCCA CCTCGACCTG 7500

AATGGAAGCC GCGGCGACCT CGCTAACGGA TTCACCACTC CAAGAATTGG AGCCAATCAA 7560

FIG. 9H

TTCTTGCGGA GAACTGTGAA TGCGCAAACC AACCCTTGGC AGAACATATC CATCGCGTCC
7620

GCCATCTCCA GCAGCCGCAC GCGGCGCATC TCGGGCAGCG TTGGGTCCCTG GCCACGGGTG
7680

CGCATGATCG TCCTCCTGTC GTTGAGGACC CGGCTAGGCT GGCGGGGTTG CCTTACTGGT
7740

TAGCAGAATG AATCACCAGT ACGCGAGCGA ACGTGAAGCG ACTGCTGCTG CAAAACGTCT
7800

GCGACCTGAG CAACAACATG AATGGTCTTC GGTTCGCGTG TTTCGTAAAG TCTGGAAACG
7860

CGGAAGTCAG CGCCCTGCAC CATTATGTTT CGGATCTGCA TCGCAGGATG CTGCTGGCTA
7920

CCCTGTGGAA CACCTACATC TGTATTAACG AAGCCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA
7980

TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA
8040

GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAAC TAAGACACGA
8100

CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG
8160

TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG
8220

TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG
8280

CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTMTGC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG
8340

AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA
8400

CGAAAAC TCA
CGAAAAC TCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT
8460

CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AACTTTGGTC
8520

TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTGCTTC
8580

ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC
8640

Handwritten signature

FIG. 9I

TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC 8700
AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC 8760
CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT 8820
GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTGCAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC 8880
TTCATTCAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA 8940
AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGT 9000
ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG 9060
CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCCGGCGACC 9120
GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAACACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA 9180
AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAAC TC AAGGATCT TACCGCTGTT 9240
GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTACTTT 9300
CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAACAGG AAGGCAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG 9360
GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCCTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA 9420
TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT 9480
AGGGGTTCCG CGCACATTT CCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT 9540
CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTTCGTCTTC AA 9592

Handwritten signature

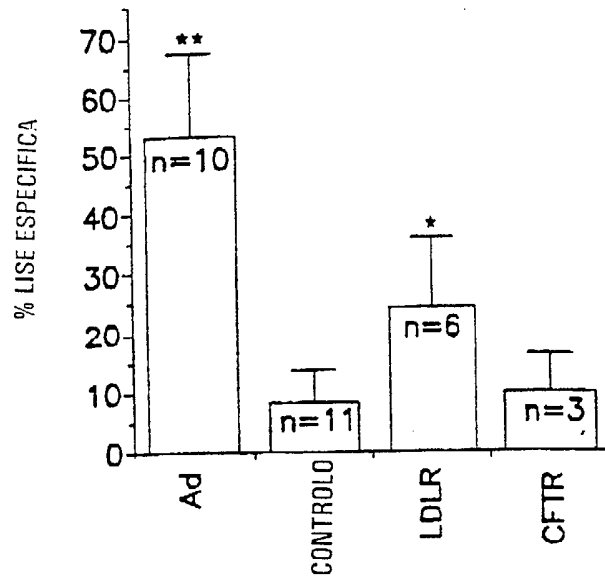


FIG. IOA

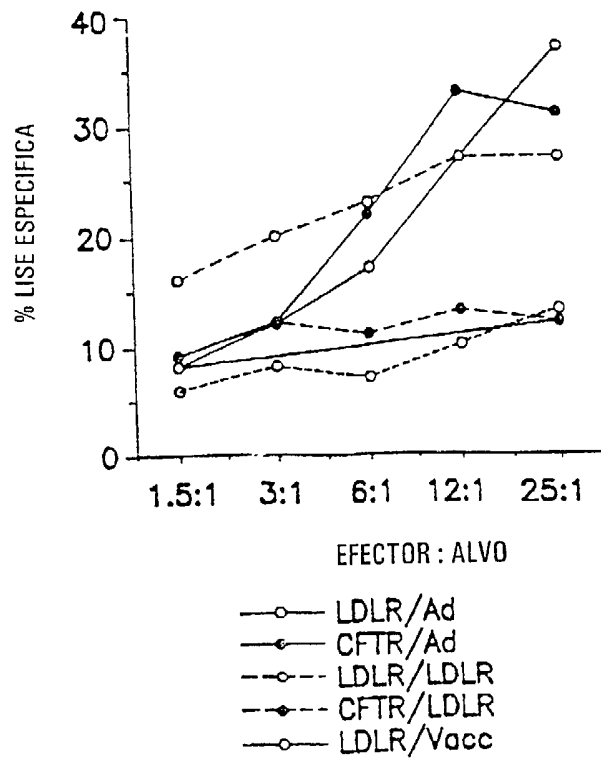


FIG. IOB

Handwritten signature

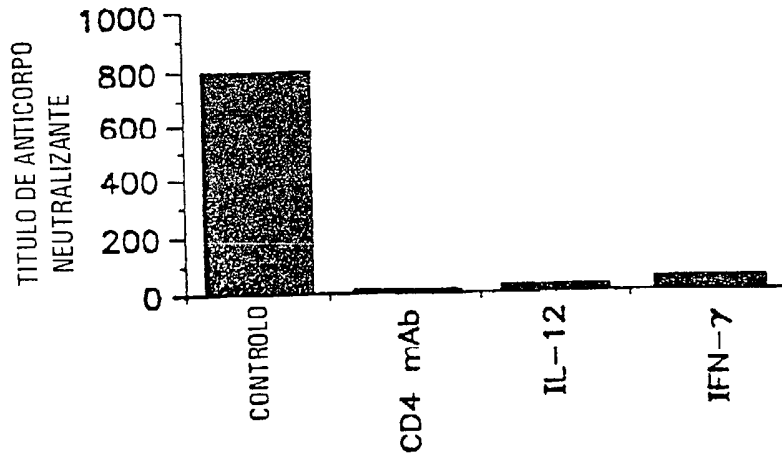


FIG. IIA

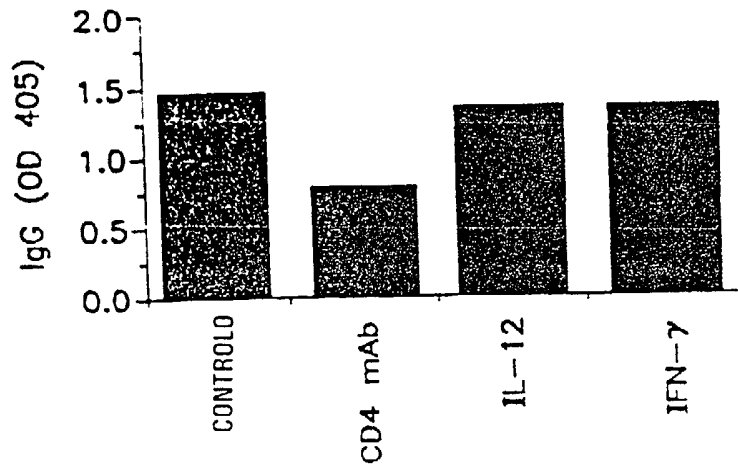


FIG. IIB

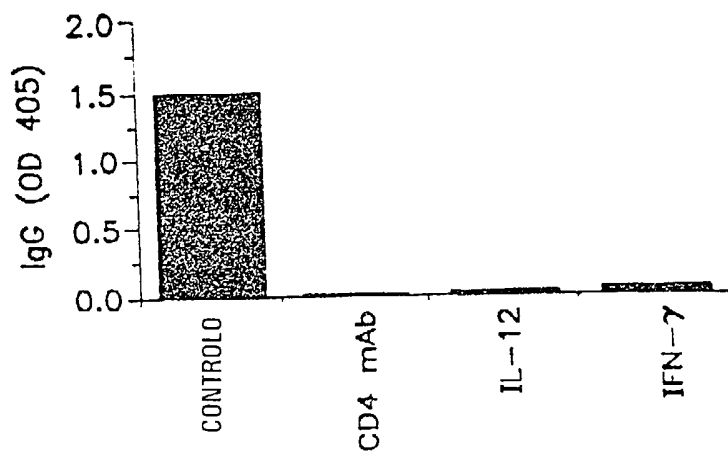


FIG. IIC