

(11) *Número de Publicação:* **PT 919627 E**

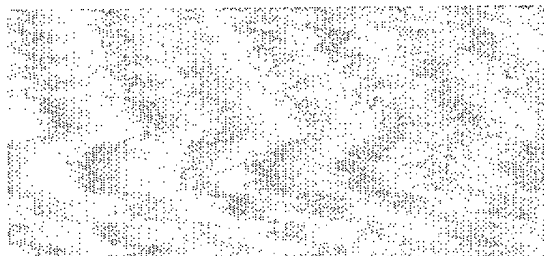
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N005/16 A C12N015/861 B
C12N015/34 B A61K048/00 B
C12N007/04 B A61K039/235 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1994.05.27	(73) Titular(es): TRANSGENE S.A. 11, RUE DE MOLSHEIM 67082 STASBOURG CÉDEX FR
(30) Prioridade: 1993.05.28 FR 9306482	
(43) Data de publicação do pedido: 1999.06.02	(72) Inventor(es): JEAN-LUC IMLER MAJID MEHTALI ANDREA PAVIRANI FR FR FR
(45) Data e BPI da concessão: 2000.09.20	(74) Mandatário(s): JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) Epígrafe: NOVAS LINHAS CELULARES DE COMPLEMENTAÇÃO PARA VECTORES ADENOVIRAIS DEFECTIVOS

(57) Resumo:



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78
Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt



258

INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. ☒	MOD. UTI. ☐	MOD. IND. ☐	DES. IND. ☐	TOP. SEMIC. ☐	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º 919.627 (11)		N.º Objectos ☐ N.º Desenhos ☐		DATA DO PEDIDO ____ / ____ / ____ (22)	
REQUERENTE (71) (NOME E MORADA) TRANSGENE S.A., francesa, industrial, com sede em 11, rue de Molsheim, 67082 Strasbourg Cédex, França					
CÓDIGO POSTAL _____					
INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72) Imier, Jean-Luc; Mehtali, Majid e Pavirani, Andrea					
REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)			FIGURA (para interpretação do resumo)		
DATA DO PEDIDO	PAIS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO			
EPIGRAFE (54) "Novas linhas celulares de complementação para vectores adenovirais defectivos"					
RESUMO (max. 150 palavras) (57) A presente invenção tem por objecto uma linha celular de complementação que comporta um elemento de complementação que compreende em especial uma parte da região E1 do genoma de um adenovirus com exclusão da ITR 5'; o referido elemento de complementação é susceptível de complementar <i>en trans</i> um vector adenoviral defectivo e é integrado no genoma da referida linha de complementação ou inserido num vector de expressão.					

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

DESCRIÇÃO

“NOVAS LINHAS CELULARES DE COMPLEMENTAÇÃO PARA VECTORES ADENOVIRAIS DEFECTIVOS”

A invenção tem por objectivo novas linhas celulares de complementação que complementam em trans as funções virais essenciais que foram eliminadas do genoma de vectores adenovirais defectivos que permitem a transferência e a expressão de genes de interesse numa célula ou num organismo eucariota hospedeiro. A invenção apresenta um interesse muito particular no tocante a perspectivas de terapia génica, em especial no homem.

Os adenovírus são vírus com ADN que apresentam um largo espectro de hospedeiro. Eles foram evidenciados em numerosas espécies animais e em numerosos tipos celulares. Existem diversos serotipos que diferem em especial ao nível da sequência dos seus genomas. A maior parte dos adenovírus humanos são pouco patogénicos e só produzem geralmente sintomas benignos.

O adenovírus penetra na célula hospedeira permissiva por intermédio de um receptor específico e depois ele é internalizado e passa em endosomas. A sua acidificação contribui para uma alteração de conformação do vírus e à sua saída do citoplasma. Depois, o ADN viral associado a determinadas proteínas virais necessárias para as primeiras etapas do ciclo replicativo, penetra no núcleo das células infectadas onde a sua transcrição é iniciada por enzimas celulares. A replicação do ADN adenoviral tem lugar no núcleo das células infectadas e não

necessita da replicação celular. A associação dos novos viriões tem igualmente lugar no núcleo. Num primeiro tempo, as proteínas virais associam-se de maneira a formar cápsides vazias com estrutura icosaédrica, nas quais o ADN adenoviral é em seguida encapsulado. As partículas virais ou viriões são libertados das células infectadas e são susceptíveis de infectar outras células permissivas.

O ciclo infeccioso do adenovírus efectua-se em duas etapas :

- a fase precoce que precede a iniciação da replicação do genoma adenoviral e que permite a produção das proteínas reguladoras que intervêm ao nível da replicação e da transcrição do ADN viral, e
- a fase tardia que conduz à síntese das proteínas estruturais.

De uma maneira geral, o genoma adenoviral é constituído por uma molécula de ADN linear, bicatenária e com cerca de 36 kb de comprimento que contém as sequências que codificam para mais de 30 proteínas. Em cada uma das suas extremidades, encontra-se presente uma curta sequência com 100 a 150 nucleotidos consoante os serotipos, invertida e designada por ITR (Inverted Terminal Repeat). As ITRs encontram-se implicadas na replicação do genoma adenoviral. A região de encapsidação, com cerca de 300 nucleotidos, encontra-se situada na extremidade 5' do genoma imediatamente após a ITR 5'.

Os genes precoces são repartidos em quatro regiões que são dispersas no genoma adenoviral, designadas por E1 a E4 (E para "Early" que significa precoce em inglês). As regiões precoces compreendem pelo menos seis unidades transcricionais que possuem os seus próprios promotores. A expressão dos genes precoces é, por sua vez, regulada, sendo alguns genes expressos antes de outros.

Três regiões, respectivamente E1, E2 e E4, são essenciais para a replicação viral. Assim, se um adenovírus for defectivo quanto a uma das suas funções, ou seja se ele não puder produzir pelo menos uma proteína codificada por uma dessas regiões, essa deverá ser fornecida *em trans*.

A região precoce E1 encontra-se situada na extremidade 5' do genoma adenoviral e contém duas unidades de transcrição virais, respectivamente E1A e E1B. Esta região codifica para proteínas que intervêm muito precocemente no ciclo viral e são essenciais para a expressão de quase todos os outros genes do adenovírus. Em particular, a unidade de transcrição E1A codifica para uma proteína trans-activadora da transcrição dos outros genes virais, que induz a transcrição a partir dos promotores das regiões E1B, E2A, E2B e E4.

Os produtos da região E2, a qual compreende igualmente duas unidades de transcrição E2A e E2B, encontram-se directamente implicados na replicação do ADN viral. Esta região governa em especial a síntese de uma proteína de 72kDa, que apresenta uma forte afinidade para o ADN de cordão simples e de uma ADN polimerase.

A região E3 não é essencial para a replicação do vírus. Ela codifica para por menos seis proteínas que seriam responsáveis pela inibição da resposta imune do hospedeiro relativamente a uma infecção por adenovírus. Em particular, a glicoproteína gp19kDa impediria a resposta CTL, responsável pela citólise das células infectadas pelas células T citotóxicas do hospedeiro.

A região E4 encontra-se situada na extremidade 3' do genoma adenoviral. Ela codifica para numerosos polipeptidos que se encontram implicados

na expressão de genes tardios, na estabilidade dos mensageiros (ARNm) tardios, na passagem da fase precoce para a fase tardia, assim como na inibição da síntese proteica celular.

Uma vez iniciada a replicação do ADN viral, a transcrição dos genes tardios começa a ter lugar. Estes ocupam a maior parte do genoma adenoviral e recobrem em parte as unidades de transcrição dos genes precoces. Mas eles são transcritos a partir de promotores diferentes e segundo um modo de entrançamento alternativo, de modo que as mesmas sequências são utilizadas para fins diferentes. A maior parte dos genes tardios são transcritos a partir do promotor principal tardio MLP (Major Late Promoter). Este promotor permite a síntese de um longo transcrito primário que é em seguida amadurecido numa vintena de ARN mensageiros (ARNm) a partir dos quais são produzidas as proteínas capsidárias do virião. O gene que codifica para a proteína estrutural IX que compõe a cápside encontra-se situado na extremidade 5' do genoma adenoviral e reveste a região E1B na sua extremidade 3'. A unidade transcricional da proteína IX utiliza o mesmo sinal de terminação da transcrição que a unidade transcricional E1B.

Um certo número de adenovírus são agora bem caracterizados geneticamente e bioquimicamente. Tal acontece com o adenovírus humano de tipo 5 (Ad5) cuja sequência se encontra divulgada no banco de dados Genbank sob a referência M73260. Foi possível localizar precisamente os diferentes genes no genoma adenoviral que compreende de 5' até 3' o ITR 5' de 103 bp seguido pela região de encapsidação (Hearing et al., 1987, *J. Virol.*, 61, 2555 - 2558) de cerca de 300 pb, depois regiões precoces e tardias cuja localização se encontra representada

esquemáticamente na figura 1 e, finalmente, ITR 3'.

Sobressai do que antecede que os adenovírus possuem características interessantes que fazem deles vectores de eleição para a transferência de genes de interesse. Numerosos adenovírus recombinantes encontram-se descritos na literatura (Rosenfeld et al., 1991, Science, 252, 431 - 434; Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68, 143 - 155). De uma maneira geral, eles derivam do Ad5 e são defectivos quanto à função E1, a fim de evitar a sua disseminação no ambiente e no organismo hospedeiro. Além disso, a região E3 não essencial pode ser igualmente eliminada. As sequências exógenas são integradas em vez da região E1 ou E3.

Assim, estes adenovírus defectivos só podem ser propagados numa linha celular que complemente *em trans* a função E1 essencial para a replicação viral. Presentemente, a única linha celular de complementação utilizável é a linha de rim embrionário 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol, 36, 59 - 72), que resulta da integração nos seus cromossomas de um fragmento do genoma do Ad5 que compreende em especial a extremidade 5' do genoma viral, de modo que a linha 293 complementa os adenovírus defectivos para a função E1. As células 293 contêm sequências que se encontram igualmente no adenovírus recombinante defectivo, como o ITR 5', comportando a região de encapsidação e a parte em 3' da região E1B sequências que codificam para as proteínas precoces.

A possibilidade de transferência de genes mediante utilização de adenovírus encontra-se agora estabelecida. No entanto, a questão da sua inocuidade mantém-se em aberto. Com efeito, eles são susceptíveis de transformar determinadas linhas celulares em cultura, o que reflecte o poder potencialmente oncogénico de

determinados produtos de expressão do genoma adenoviral, essencialmente da região E1 e provavelmente E4, pelo menos para determinados serotipos. Além disso, a probabilidade de recombinação genética entre um adenovírus defectivo da técnica anterior, em especial um adenovírus recombinante e/ou um adenovírus natural ou selvagem (resultante de uma contaminação acidental ou de uma infecção oportunista de um organismo hospedeiro), ou um fragmento de genoma adenoviral integrado na linha de complementação 293 não é desprezável. Com efeito, basta um evento de recombinação para restaurar a função E1 e gerar um adenovírus recombinante não defectivo capaz de se dessiminar no ambiente. É também de prever que um adenovírus natural selvagem que co-infecta a mesma célula que um adenovírus defectivo possa complementar este último para a função E1 que provoca uma co-disseminação dos dois vírus. Finalmente, certos tipos de células eucariotas produzem proteínas que apresentam uma actividade E1A-like igualmente susceptíveis de complementar parcialmente os adenovírus defectivos que as infectam.

É portanto aconselhável dispor de vectores adenovirais performantes que apresentem o mínimo de risco, com vista à sua utilização em terapia génica para corrigir *in vivo* defeitos genéticos graves e tratar determinadas doenças para as quais não se dispõe de vias terapêuticas eficazes. É da sua obtenção que depende o sucesso da terapia génica aplicada ao homem.

Além disso, existem interrogações a propósito da obtenção da linha 293. Essas interrogações podem ser de natureza a comprometer a aceitabilidade dos produtos destinados a um uso humano que dela são derivados. Seria útil dispor de

linhas de complementação cuja origem e história fossem exactamente conhecidas para produzir partículas de adenovírus recombinantes destinadas a uma utilização humana.

Descobriu-se agora (1) novos vectores adenovirais defectivos eliminados de certas regiões específicas do genoma adenoviral e mais adaptados à transferência de uma sequência nucleotídica exógena in vivo e (2) novas linhas de complementação caracterizadas, aceitáveis de um ponto de vista farmacêutico e, portanto, que oferecem todas as características de segurança requeridas para a produção de produtos destinados a uma utilização humana.

O interesse destes novos vectores é que eles apresentam uma capacidade de clonagem acrescida que permite a inserção de um ou mais genes de interesse de grande tamanho e uma segurança de emprego máxima. Estas mutações deletérias tornam esses adenovírus insusceptíveis de replicação autónoma e de transformação celular e isto sem alterar a sua capacidade para transferir e exprimir um gene de interesse.

Esses vectores adenovirais são defectivos para a replicação, eles são susceptíveis de serem encapsidados numa célula de complementação e eles são derivados do genoma de um adenovírus que compreende de 5' em 3', uma ITR 5', uma região de encapsidação, uma região E1A, uma região E1B, uma região E2, uma região E3, uma região E4 e uma ITR 3', por eliminação :

- (i) de toda ou parte da região E1A, e da totalidade da parte da região E1B que codifica para as proteínas precoces; ou
- (ii) de toda ou parte da região E1A e de toda ou parte de pelo menos

uma região seleccionada entre as regiões E2 e E4;

- (iii) de toda ou parte da região E1A e de uma parte da região de encapsidação.

No sentido da presente invenção, o termo “eliminação” ou “desprovido” refere-se à supressão de pelo menos um nucleotido na região alvo e como é evidente pode tratar-se de uma eliminação contínua ou descontínua. Por toda ou parte, entende-se quer a totalidade ou uma parte apenas da região considerada. Preferem-se as eliminações que impedem a produção de pelo menos um produto de expressão codificado pela referida região. Eles podem portanto situar-se numa região codificante ou numa região reguladora como a região promotora e respeitar pelo menos um nucleotido de maneira a destruir o quadro de leitura de um gene ou tornar uma região promotora não funcional. Podem tratar-se igualmente de eliminações parciais de um ou mais genes da referida região ou do conjunto da região.

Um vector adenoviral conforme descrito anteriormente é defectivo para a replicação mas é susceptível de ser replicado e encapsidado numa célula de complementação que lhe fornece em trans o ou os produto(s) para os quais ele é defectivo a fim de gerar uma partícula adenoviral (ainda designada adenovírus defectivo) e susceptível de replicação autónoma numa célula hospedeiro mas, no entanto, infecciosa uma vez que tem a capacidade de fornecer o vector numa célula hospedeira.

De acordo com uma primeira variante, o vector adenoviral deriva do genoma de um adenovírus natural ou selvagem por eliminação de toda ou parte da região E1A e da parte da região E1B que compreende a totalidade das sequências

que codificam para as proteínas precoces. De acordo com um modo preferido, ela diz respeito ao promotor e às sequências que codificam para os produtos de expressão da região E1B ou seja as proteínas precoces e não inclui toda ou parte do sinal de terminação da transcrição que reveste as sequências que codificam para a proteína tardia IX. Tratando-se de um vector adenoviral que deriva de um adenovirus humano de tipo 5, a referida eliminação compreende pelo menos as sequências compreendidas entre os nucleotidos 1634 e 3509 do genoma adenoviral cuja sequência é tal como divulgada no banco de dados Genebank sob a referência M73260. Esta eliminação tem por objectivo reduzir ou suprimir as sequências comuns entre um vector adenoviral conforme descrito anteriormente e o fragmento do genoma adenoviral integrado numa linha celular de complementação, por exemplo a linha 293. Além disso, ela elimina de um vector adenoviral de acordo com a invenção sequências cujos produtos de expressão são potencialmente oncogénicos, pelo menos em associação com os produtos de expressão da região E1A.

Além disso, o vector adenoviral deriva ainda do genoma de um adenovirus natural ou selvagem por eliminação de toda ou parte :

- da região E3 e/ou
- da região E2 e/ou
- da região E4.

É óbvio que o vector adenoviral pode comportar uma das três eliminações mencionadas anteriormente ou duas de entre elas segundo qualquer combinação ou ainda o conjunto das eliminações.

De acordo com um modo particularmente vantajoso, o vector adenoviral é eliminado de uma parte apenas da região E3 e de preferência da parte que não compreende as sequências que codificam para a proteína gp19kDa. A presença de sequência que codifica para a proteína gp19kDa no vector adenoviral permitirá às células infectadas escapar-se à imunovigilância do hospedeiro; um critério importante quando o protocolo terapêutico necessita de várias administrações repetidas. Escolher-se-á, de preferência, colocar as sequências que codificam para a gp19kDa sob o controlo de elementos apropriados que permitem a sua expressão na célula hospedeiro, a saber os elementos necessários para a transcrição das referidas sequências em ARNm e a tradução deste último em proteína. Os elementos compreendem em particular um promotor. Tais promotores são bem conhecidos do especialista da matéria e encontram-se inseridos a montante da referida sequência codificante pelas técnicas convencionais de engenharia genética. O promotor retido será, de preferência, um promotor constitutivo não activável por um dos produtos de expressão da região E1A. A título de exemplos, pode-se citar o promotor do gene HMG (Hidroxi-Metil-Glutaril coenzima A redutase), o promotor precoce do vírus SV40 (Simian Vírus 40 = vírus de símio 40), o LTR (Long Terminal Repeat) do RSV (Rous Sarcoma Vírus) ou o promotor de um gene PGK (fosfo-glicerato-quinase) de eucariota superior.

Além disso, o vector adenoviral pode, de maneira opcional, ser eliminado da parte da região E3 que corresponde à região promotora, a qual será substituída por uma região promotora heteróloga, tal como uma das mencionadas anteriormente.

De acordo com uma segunda variante, o vector adenoviral deriva do

genoma de um adenovírus natural ou selvagem por eliminação contínua ou descontínua de toda ou parte da região E1A e de toda ou parte de pelo menos a região E2 e/ou E4. Uma tal eliminação permite aumentar as possibilidades de clonagem de genes de interesse. Por outro lado, eliminar toda ou parte da região E4 permite igualmente reduzir ou suprimir sequências que codificam para produtos potencialmente oncogénicos.

Tal como anteriormente, o vector adenoviral pode, além disso, ser desprovido de toda ou parte das regiões E1B e/ou E3 e, em particular, de acordo com um modo de realização tal como mencionado anteriormente (como a eliminação da parte da região E1B que compreende a totalidade das sequências que codificam para as proteínas precoces e a parte da região E3 que não codifica para a proteína gp19kDa).

Finalmente, de acordo com uma terceira variante, o vector adenoviral deriva do genoma de um adenovírus por eliminação de toda ou parte da região E1A e de uma parte da região de encapsidação.

Uma eliminação parcial da região de encapsidação permite reduzir notavelmente a probabilidade de disseminação descontrolada do vector adenoviral quando este último se encontra na presença de um adenovírus selvagem. Uma tal eliminação permite afectar as suas funções de encapsidação de tal modo que mesmo no caso de complementação em trans da função defectiva desta última por um adenovírus selvagem, ele poderá ser encapsidado eficazmente em relação ao genoma do adenovírus selvagem competidor.

As eliminações da região de encapsidação serão escolhidas em função de

dois critérios : uma capacidade reduzida para ser encapsidado mas simultaneamente uma eficácia residual compatível com uma produção industrial. Por outras palavras, a função de encapsidação de um vector adenoviral de acordo com a invenção é substancialmente mantida embora num grau menor. A atenuação pode ser determinada pelas técnicas convencionais de titulação por infecção de uma linha adequada e avaliação do número de regiões de lise. Tais técnicas são conhecidos do perito da matéria. No quadro da invenção, a eficácia de encapsidação é reduzida de um factor de 2 a 50, vantajosamente 3 a 20 e de preferência 5 a 10 relativamente a um adenovírus testemunha que tem uma região de encapsidação do tipo selvagem.

Como é evidente, o vector adenoviral atenuado pode, além disso, compreender pelo menos uma ou uma qualquer combinação das eliminações citadas anteriormente.

O vector adenoviral derivado do genoma de um adenovírus natural ou selvagem, vantajosamente de um adenovírus canino, aviário ou humano, de preferência de um adenovírus humano de tipo 2, 3, 4, 5 ou 7 e, de maneira absolutamente preferida, de um adenovírus humano de tipo 5 (Ad5). Neste último caso, as eliminações do vector adenoviral são indicadas por referência à posição dos nucleótidos do genoma do Ad5 especificada no banco de dados Genbank com a referência M73260.

Prefere-se muito particularmente um vector adenoviral que deriva do genoma de um adenovírus humano de tipo 5, por eliminação :

- (i) da totalidade da parte que codifica para as proteínas precoces da região E1B e que se estende do nucleotido 1634 e que termina no

nucleotido 4047; e/ou

- (ii) da região E4 que se estende dos nucleotidos 32800 a 35826; e/ou
- (iii) da parte da região E3 que se estende dos nucleotidos 27871 a 30748; e/ou
- (iv) da parte da região de encapsidação :
 - que vai do nucleotido 270 ao nucleotido 346; ou
 - que vai do nucleotido 184 ao nucleotido 273; ou
 - que vai do nucleotido 287 ao nucleotido 358.

De preferência, o vector adenoviral deriva do genoma de um adenovírus selvagem ou natural por eliminação de pelo menos 18 % do dito genoma, de pelo menos 22 %, de pelo menos 25 %, de pelo menos 30 %, de pelo menos 40 %, de pelo menos 50 %, de pelo menos 60 %, de pelo menos 70 %, de pelo menos 80 %, de pelo menos 90 % ou ainda de pelo menos 95 % e em especial de 98,5 %.

De acordo com um modo particularmente preferido, o vector adenoviral deriva do genoma de um adenovírus por eliminação do conjunto do genoma adenoviral com exclusão das ITRs 5' e 3' e de toda ou parte da região de encapsidação. De acordo com esta variante, ele só compreende o mínimo de sequências virais de modo a limitar os riscos de recombinação, os riscos de oncogenicidade e ter uma capacidade de clonagem máxima. Falar-se-á então de um vector adenoviral "mínimo" no qual será então possível inserir até 30 kb de sequência nucleotídica exógena. Um vector adenoviral preferido de acordo com a invenção deriva de um adenovírus humano de tipo 5 por eliminação da parte do genoma viral que se estende dos nucleotidos 459 a 35832.

No quadro da presente invenção, o vector adenoviral tem por objecto a transferência e a expressão de uma sequência nucleotídica exógena numa célula hospedeira. Por “sequência nucleotídica exógena”, entende-se um ácido nucleico que compreende sequências codificadoras e sequências reguladoras que permitem a expressão das referidas sequências codificadoras e no qual as sequências codificadoras são sequências que não se encontram normalmente presentes no genoma de um adenovírus. As sequências reguladoras podem ser de origem qualquer. A sequência nucleotídica exógena é introduzida no vector adenoviral pelas técnicas clássicas de engenharia genética, entre a região de encapsidação e a ITR 3’.

Uma sequência nucleotídica exógena pode ser constituída por um ou mais gene(s) de interesse e, de uma maneira preferida, de interesse terapêutico. No quadro da presente invenção, um gene de interesse pode codificar quer para um ARN anti-sentido, quer para um ARNm que será em seguida traduzido em proteína de interesse. Um gene de interesse pode ser de tipo genómico, de tipo ADN complementar (ADNc) ou de tipo misto (minigene, no qual pelo menos um intrão foi eliminado). Ele pode codificar para uma proteína madura, um precursor de uma proteína madura, em especial um precursor destinado a ser segregado e que compreende por essa razão um péptido sinal, uma proteína quimérica que provém da fusão de sequência de origem diversa ou um mutante de uma proteína natural que apresenta propriedades biológicas melhoradas ou modificadas. Um tal mutante pode ser obtido através da mutação, eliminação, substituição e/ou adição de um ou mais nucleotido(s) do gene que codifica para a proteína natural.

Um gene de interesse pode ser colocado sob o controle de elementos apropriados à sua expressão numa célula hospedeira. Por “elementos apropriados”, entende-se o conjunto dos elementos necessários à sua transcrição em ARN (ARN anti-sentido ou ARNm) e à tradução de um ARNm em proteína. Entre os elementos necessários para transcrição, o promotor reveste-se de uma importância particular. Pode tratar-se de um promotor constitutivo ou de um promotor regulável e pode ser isolado de um gene qualquer de origem eucariota ou viral e mesmo adenoviral. Como alternativa, pode tratar-se do promotor natural do gene de interesse em questão. De uma maneira geral, um promotor em uso na presente invenção, pode ser modificado de maneira a conter sequências reguladoras. A título de exemplo, um gene de interesse em uso na presente invenção, é colocado sob o controle do promotor dos genes de imunoglobulina quando se procura alvejar a sua transferência em células hospedeiras linfocitárias. Pode-se citar igualmente o promotor do gene TK-HSV-1 (timidina quinase do vírus da herpes de tipo 1) ou ainda o promotor adenoviral MLP, em especial o adenovírus humano do tipo 2, que permite uma expressão num grande número de tipos celulares.

Entre os genes de interesse utilizados no quadro da presente invenção, pode-se citar:

- os genes que codificam para as citoquinas, como o interferão alfa, o interferão gama, as interleucinas;
- os genes que codificam para receptores membranários, como os receptores reconhecidos por organismos patogénicos (vírus, bactérias ou parasitas), de preferência pelo vírus VIH (Vírus da

Imunodeficiência Humana);

- os genes que codificam para factores de coagulação, como o factor VIII e o factor IX;
- o gene que codifica para a distrofina;
- o gene que codifica para a insulina;
- os genes que codificam para proteínas que participam directamente ou indirectamente nos canais iónicos celulares, como a proteína CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator);
- os genes que codificam para ARN anti-sentido ou proteínas susceptíveis de inibir a actividade de uma proteína produzida por um gene patogénico, presente no genoma de um organismo patogénico, ou por um gene celular, cuja expressão se encontra desregulada, por exemplo um oncogene;
- os genes que codificam para uma proteína que inibe uma actividade enzimática, como a α 1-antitripsina ou um inibidor de uma protease viral;
- os genes que codificam para variantes de proteínas patogénicas, que foram mutadas de modo a alterar a sua função biológica, como por exemplo variantes trans-dominantes da proteína TAT do vírus VIH susceptíveis de competição com a proteína natural para a ligação à sequência alvo, impedindo assim a activação do VIH;
- os genes que codificam para os epitopes antigenéticos a fim de aumentar a imunidade da célula hospedeira;

- os genes que codificam para as proteínas de complexo principal de histocompatibilidade das classes I e II, assim como os genes que codificam para as proteínas indutoras desses genes;
- os genes que codificam para enzimas celulares ou produzidas por organismos patogênicos; e
- os genes suicidas. Pode-se citar mais particularmente o gene suicida TK-HSV-1. A enzima TK viral apresenta uma afinidade nitidamente superior em relação à enzima TK celular para determinados análogos de nucleosídeos (como o aciclovir ou o ganciclovir). Ela converte-os em moléculas monofosfatadas, por sua vez convertíveis, pelas enzimas celulares, em precursores de nucleotídeos, que são tóxicos. Esses análogos de nucleotídeos são incorporáveis nas moléculas de ADN em via de síntese, portanto principalmente no ADN das células em estado de replicação. Esta incorporação permite destruir especificamente as células em divisão como as células cancerosas.

Esta lista não é limitativa e podem ser utilizados outros genes de interesse no quadro da presente invenção.

Além disso, de acordo com um outro modo de realização da invenção, o vector adenoviral pode ainda compreender um gene não-terapêutico que codifica para uma proteína trans-ativadora da transcrição não-adenoviral. Como é evidente, evitar-se-á o ou os gene(s) da região E1A que codificam para uma proteína trans-ativadora, cuja expressão correria o risco de tornar o adenovirus não-defectivo. Escolher-se-á, de preferência, o gene que codifica para a proteína Gal4 de

Saccharomyces cerevisiae. A sua expressão permitirá a propagação do vector numa linha de complementação tal como a descrita a seguir. Uma tal linha é mais sofisticada e permite remediar eventuais problemas de toxicidade devidos à produção em contínuo das proteínas adenovirais de complementação. O gene que codifica para uma proteína trans-activadora da transcrição pode ser colocado, se necessário, sob o controlo de elementos apropriados para a sua expressão; por exemplo os que permitem a expressão de um gene de interesse.

O vector adenoviral pode encontrar-se compreendido numa célula eucariota hospedeira sob a forma de um vector adenoviral ou sob a forma de uma partícula adenoviral. A referida célula é vantajosamente uma célula de mamífero e, de preferência, uma célula humana e pode compreender o referido vector sob forma integrada no genoma ou, de preferência, sob forma não-integrada (episoma).

A partícula adenoviral pode ser preparada mediante passagem em qualquer linha celular de complementação que fornece *en trans* as funções para as quais o vector adenoviral tal como descrito anteriormente é defectivo, por exemplo a linha 293 da técnica anterior. Essas técnicas de preparação são conhecidas do especialista na matéria (Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, 109-128, Ed: E.J. Murey, The Human Press Inc.). De uma maneira opcional, a partícula adenoviral pode ser gerada numa linha celular de complementação de acordo com a invenção tal como se descreve a seguir.

É por essa razão que a presente invenção diz respeito a uma linha celular de complementação que comporta um elemento de complementação, que compreende em particular uma parte da região E1 do genoma de um adenovírus com

exclusão da ITR 5'; sendo o referido elemento de complementação susceptível de complementar *en trans* um vector adenoviral defectivo e sendo integrado no genoma da referida linha celular de complementação ou inserido num vector de expressão.

No quadro da presente invenção, a expressão "linha celular de complementação" refere-se a uma célula eucariota susceptível de fornecer *en trans* a ou as função (funções) para a qual (quais) um vector adenoviral é defectivo. Por outras palavras, ela é susceptível de produzir uma ou as proteína(s) necessária(s) à replicação e à encapsidação do referido vector adenoviral, proteínas precoces e/ou tardias que não foi possível por si mesmo produzir e que são necessárias à constituição de uma partícula viral. Como é evidente, a referida parte pode ser modificada por mutação, eliminação e/ou adição de nucleotidos, desde que essas modificações não alterem a sua capacidade de complementação. Assim, um vector adenoviral defectivo para a função E1 deverá ser propagado numa linha celular de complementação para E1 (susceptível de fornecer *en trans* a proteína ou o conjunto das proteínas codificadas pela região E1 que o vector não pode produzir), um vector defectivo para as funções E1 e E4 sê-lo-á numa linha celular de complementação para E1 e E4 (fornecendo as proteínas necessárias codificadas pelas regiões E1 e E4) e, finalmente, um vector defectivo para as funções E1, E2 e E4 sê-lo-á numa linha celular de complementação para as três funções. Tal como indicado na introdução, a região E3 é não essencial, e não necessita de ser especificamente completada.

Uma linha celular de complementação de acordo com a invenção, pode ser derivada quer de uma linha celular imortalizada, susceptível de se dividir indefinidamente, ou de uma linha primária. Consoante os objectivos pretendidos

pela presente invenção, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção é útil para a encapsidação de qualquer vector adenoviral defectivo e, em particular, de um vector adenoviral defectivo tal como descrito anteriormente. Assim, quando se utilizar no seguimento a expressão "vector adenoviral defectivo", deve entender-se que se faz referência a um vector defectivo qualquer, da técnica anterior ou conforme descrito anteriormente.

Por "elemento de complementação", entende-se um ácido nucleico que compreende pelo menos a parte do genoma adenoviral em uso no quadro da presente invenção. Ele pode ser inserido num vector, por exemplo de tipo plasmídico ou viral, por exemplo retroviral, adenoviral ou derivado de um pox-vírus. Prefere-se, no entanto, o caso em que ele é integrado no genoma de uma linha celular de complementação de acordo com a invenção. Os métodos para introduzir um vector ou um ácido nucleico numa linha celular e eventualmente integrá-lo no genoma de uma célula constituem técnicas convencionais bem conhecidas do perito na especialidade, do mesmo modo que os vectores utilizáveis para tais fins. O elemento de complementação pode ser introduzido numa linha de complementação de acordo com a invenção, de maneira prévia ou concomitante com um vector adenoviral defectivo.

De acordo com um modo de realização específico, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção é destinada a complementar *en trans* um vector adenoviral defectivo para a função E1. Uma tal linha apresenta a vantagem de diminuir os riscos de recombinação uma vez que, ao contrário da linha convencional 293, ela encontra-se desprovida da ITR 5' presente nos vectores.

No quadro da presente invenção, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção pode compreender toda ou parte da região E1A do genoma de um adenovírus e:

- (i) toda ou parte de pelo menos uma região do genoma adenoviral escolhida entre as regiões E1B, E2 e E4, ou
- (ii) toda ou parte de pelo menos duas das regiões E1B, E2 e E4 do referido genoma, ou
- (iii) toda ou parte das regiões E1B, E2 e E4 do referido genoma.

No quadro da invenção, as referidas regiões podem ser colocadas, se necessário, sob o controlo de elementos apropriados que permitem a sua expressão, mas, prefere-se colocá-los sob o controlo do seu próprio promotor, induzível pela proteína trans-activadora de transcrição codificada pela região E1A.

A título indicativo, uma linha celular de complementação de acordo com a variante (ii) que compreende as regiões E1A, E1B e E4 destina-se à preparação de um adenovírus defectivo para as funções E1 e E4 eliminada de toda ou parte das regiões correspondentes.

De acordo com um modo vantajoso, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção, compreende em particular toda ou parte da região E1A e a totalidade das sequências que codificam para as proteínas precoces da região E1B.

Além disso, de acordo com uma variante deste modo de realização, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção pode, além disso, ser desprovida da região promotora da região E1A. Neste caso, a parte do genoma

adenoviral que codifica para as proteínas precoces da referida região E1A será colocada sob o controlo de um promotor heterólogo apropriado e funcional na referida linha celular de complementação. Pode ser isolado a partir de qualquer gene eucariota ou viral. Evitar-se-á, no entanto, o recurso a um promotor adenoviral de uma região precoce. Pode tratar-se de um promotor constitutivo. A título de exemplos, pode-se citar os promotores do vírus SV40, do gene TK-HSV-1 e do gene murino PGK.

De uma maneira alternativa, o promotor retido pode ser regulável e, vantajosamente, indutível por uma proteína trans-activadora de transcrição não adenoviral. Pode tratar-se de um promotor isolado de um gene naturalmente indutível ou de um promotor qualquer modificado pela adição de sequências de activação (ou UAS, para Upstream Activating Sequence, em inglês) que respondem à referida proteína trans-activadora. De maneira mais particular, prefere-se utilizar um promotor indutível pela proteína Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* e, de preferência, um promotor híbrido constituído por um promotor dito “mínimo” que contém unicamente as sequências de iniciação da transcrição (TATA box e sítio de iniciação) de um gene qualquer (por exemplo do gene TK-HSV-1 ou MLP de Ad2), a montante do qual se inseriu pelo menos uma sequência de activação do gene Gal10 de *Saccharomyces cerevisiae* (Webster et al., 1988, Cell, 52, 169-178). Esta última pode ser sintetizada quimicamente ou isolada a partir do gene Gal10, de acordo com as técnicas clássicas de engenharia genética. Assim, o promotor híbrido não será activado e só induzirá a expressão dos genes codificados pela região E1A, colocados sob o seu controlo, na presença da proteína Gal4. Depois, os produtos de

expressão da região E1A poderão, por sua vez, induzir a expressão das outras regiões precoces E1B, E2 e/ou E4 eventualmente compreendidas numa linha celular de complementação de acordo com a invenção. Esse modo de realização particular da invenção, evita a produção de uma maneira constitutiva (eventualmente tóxica) de proteínas adenovirais necessárias à complementação. Assim, a indução pode ser desencadeada na presença de um vector adenoviral defectivo tal como descrito anteriormente que exprime a proteína Gal4. No entanto, uma tal linha pode igualmente ser utilizada para preparar qualquer vector adenoviral defectivo, com a condição, no entanto, de fornecer *en trans* a proteína Gal4. Os meios de fornecer *en trans* uma proteína são conhecidos do perito na matéria.

De uma maneira geral, uma linha celular de complementação compreende uma parte do genoma de um adenovírus que deriva vantajosamente de um adenovírus animal, como um adenovírus canino ou aviário ou, de preferência, de um adenovírus humano e, muito particularmente, do tipo 2 ou 5.

Uma linha celular de complementação de acordo com a invenção compreende em especial a parte do genoma de um adenovírus humano de tipo 5 que se estende:

- (i) do nucleotido 100 ao nucleotido 5297 da sequência tal como divulgado no banco de dados Genebank sob a referência M73260, ou
- (ii) do nucleotido 100 ao nucleotido 4034, ou
- (iii) do nucleotido 505 ao nucleotido 4034.

Vantajosamente, a parte do genoma de acordo com (ii) é inserida a

montante de um sinal de terminação da transcrição, como por exemplo o sinal de poliadenilação do vírus SV40 (Simian Vírus 40) ou do gene β -globina de coelho. Muito embora a parte de acordo com (iii) que não compreende nem as sequências promotoras da região E1A, nem o sinal de terminação da transcrição da região E1B se encontre colocada sob o controlo de um promotor apropriado, em especial de um promotor induzível pela proteína Gal4, e de um sinal de terminação da transcrição, por exemplo o do gene β -globina de coelho. Uma tal linha celular de complementação é considerada como particularmente segura pois é desprovida da maior parte das sequências comuns com um adenovírus defectivo.

Por outro lado, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção pode comportar a parte da região E4 de um adenovírus humano de tipo 5 que vai do nucleotido 32800 e que termina no nucleotido 35826 da sequência tal como divulgado no banco de dados Genbank sob a referência M73260.

Além disso, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção pode comportar o conjunto do genoma de um adenovírus natural, com excepção da região de encapsidação e das ITRs 5' e 3' e, de maneira absolutamente preferida, a parte do genoma de um adenovírus humano de tipo 5 que vai do nucleotido 505 e que termina no nucleotido 35826 da sequência tal como divulgada no banco de dados Genbank sob a referência M73260. Para as finalidades da presente invenção, aquela encontra-se colocada sob o controlo de um promotor apropriado. Recorre-se, de preferência, a um promotor induzível pela proteína Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Uma tal linha permitirá complementar *en trans* o conjunto das funções essenciais para a replicação e a encapsidação de um vector

adenoviral defectivo para as funções E1, E2 e E4, em especial de um vector adenoviral mínimo de acordo com a invenção.

De acordo com um modo preferido, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção pode comportar um elemento de complementação que compreende, além disso, um gene que codifica para um marcador de selecção que permite a detecção e o isolamento das células que o comportam. No contexto da presente invenção, pode tratar-se de qualquer gene que codifique para um marcador de selecção, sendo estes geralmente conhecidos do perito na matéria, vantajosamente de um gene de resistência a um antibiótico e, de preferência, do gene que codifica para a puromicina acetil-transferase (gene pac) que confere a resistência à puromicina.

No quadro da presente invenção, o gene que codifica para um marcador de selecção pode ser colocado sob o controlo de elementos apropriados que permitem a sua expressão. Pode tratar-se de um promotor constitutivo, tal como o promotor precoce do vírus SV40. No entanto, prefere-se um promotor induzível pela proteína trans-activadora codificada pela região E1A, em particular o promotor adenoviral E2A. Uma tal combinação introduzirá uma pressão de selecção para manter a expressão dos genes da região E1A numa linha celular de complementação de acordo com a invenção. Para os objectivos da presente invenção, o promotor retido pode ser modificado por eliminação, mutação, substituição e/ou adição de nucleotidos.

De acordo com um modo de realização absolutamente preferido, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção é derivada de uma linha

celular aceitável de um ponto de vista farmacêutico. Por “linha celular aceitável de um ponto de vista farmacêutico”, entende-se uma linha celular caracterizada (de que se conhece a origem e a história) e/ou tendo já sido utilizada para a produção em grande escala de produtos destinados a uso humano (constituição de lotes para ensaios clínicos avançados ou lotes destinados à venda). Tais linhas encontram-se disponíveis em organismos tais como a ATCC. A este respeito, podem-se mencionar as linhas de rim de macaco verde de África Vero, de rim de criceto dourado ou sírio BHK, humano derivado de um carcinoma de pulmão A549, humana-pulmonar MRC5, humana-pulmonar W138 e de ovário de criceto chinês CHO.

De uma maneira alternativa, uma linha celular de complementação de acordo com a invenção pode derivar de células primárias e em especial de células de retina recolhidas de um embrião humano.

A invenção refere-se igualmente a um processo de preparação de uma partícula adenoviral segundo o qual:

- se introduz um vector adenoviral tal como descrito anteriormente numa linha celular de complementação susceptível de complementar *en trans* o referido vector, de modo a obter-se uma linha celular de complementação transfectada,
- se cultiva a referida linha celular de complementação de acordo com condições apropriadas para permitir a produção da referida partícula adenoviral, e
- se recupera a referida partícula na cultura celular.

Como é evidente, a partícula adenoviral pode ser recuperada do sobrenadante de cultura mas, igualmente, das culturas de acordo com os protocolos convencionais.

De uma maneira preferida, um processo de acordo com a presente invenção utiliza uma linha celular de complementação de acordo com a invenção.

A invenção tem igualmente por objecto a utilização de uma linha celular de complementação de acordo com a invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para transferir moléculas de ADN numa célula ou num organismo eucariota.

A presente invenção diz finalmente respeito a uma composição farmacêutica que compreende, a título de agente terapêutico ou profilático, uma célula de complementação de acordo com a invenção, em associação com um suporte aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

A composição de acordo com a invenção é, em particular destinada ao tratamento preventivo ou curativo de doenças tais como:

- doenças genéticas, tais como a hemofilia, a mucoviscidose ou a miopatia, a de Duchêne e de Becher,
- cancro, como os induzidos por oncogenes ou vírus,
- doenças retrovirais, como o SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida que resulta da infecção pelo VIH), e
- doenças virais recorrentes, tais como as infecções virais provocadas pelo vírus da herpes.

Uma composição farmacêutica de acordo com a invenção pode ser

fabricada de maneira convencional. Em particular, associa-se uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente terapêutico ou profilático com um suporte tal como um diluente. Uma composição de acordo com a invenção pode ser administrada por aerosol ou por qualquer via convencional em uso no domínio da especialidade, em especial por via oral, subcutânea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intrapulmonar ou intratraqueal. A administração pode ter lugar em dose única ou repetida uma ou mais vezes após um certo intervalo de tempo. A via de administração e a dosagem apropriadas variam em função de diversos parâmetros, por exemplo, do indivíduo tratado ou da doença a tratar ou ainda do ou dos gene(s) de interesse a transferir. De uma maneira geral, uma composição farmacêutica de acordo com a invenção compreende uma dose de adenovírus de acordo com a invenção compreendida entre 10^4 e 10^{14} , vantajosamente entre 10^5 e 10^{13} e de preferência entre 10^6 e 10^{11} . Uma composição farmacêutica, em particular para fins profiláticos, pode compreender ainda um adjuvante aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

A presente invenção encontra-se mais completamente descrita com referência às figuras seguintes e por meio dos exemplos seguintes.

A figura 1 é uma representação esquemática do genoma do adenovírus humano de tipo 5 (representado em unidades arbitrárias de 0 a 100) que indica a localização dos diferentes genes.

A Figura 2 é uma representação esquemática do vector pTG6546.

A Figura 3 é uma representação esquemática do vector pTG6581.

A Figura 4 é uma representação esquemática do vector pTG6303.

A Figura 5 é uma representação esquemática dos vectores pTG1660 e pTG1661.

A Figura 6 é uma representação esquemática dos vectores pTG1653, pTG1654 e pTG1655.

A Figura 7 é uma representação esquemática do vector pTG5913.

A Figura 8 é uma representação esquemática do vector pTG8512.

A Figura 9 é uma representação esquemática do vector pTG8513.

A Figura 10 é uma representação esquemática do vector pTG8614.

A Figura 11 é uma representação esquemática do vector pTG8515.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes limitam-se a ilustrar um modo de realização da presente invenção.

As construções descritas a seguir são realizadas de acordo com as técnicas gerais de engenharia genética e de clonagem molecular, pormenorizadas em Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). O conjunto das etapas de clonagem que utilizam plasmídeos bacterianos realiza-se mediante passagem na estirpe *Escherichia coli* (*E. Coli*) 5K ou BJ, enquanto que as que utilizam vectores derivados do fago M13 são realizadas por passagem em *E. coli* NM 522. No que diz respeito às etapas de ampliação por PCR, aplica-se o protocolo tal como descrito no PCR Protocols-A guia de métodos e aplicações, (1990, editado por Innis, Gelfand, Sninsky e White, Academic Press Inc.).

Por outro lado, as células são transfectadas de acordo com as técnicas

convencionais bem conhecidas do perito na especialidade. Pode-se citar a técnica do fosfato de cálcio (Maniatis et al., *supra*). Mas outros protocolos que permitem introduzir um ácido nucleico numa célula podem igualmente ser utilizados, tais como a técnica do DEAE dextrano, a electroporação, os métodos baseados em choques osmóticos, a microinjecção de uma célula seleccionada ou os métodos baseados no emprego de liposomas.

Os fragmentos inseridos nas diferentes construções descritas a seguir, são indicados precisamente de acordo com a sua posição na sequência nucleotídica :

- do genoma do Ad5 tal como divulgado no banco de dados Genebank sob a referência M73260,
- do genoma do adenovírus de tipo 2 (Ad2) tal como divulgado no banco de dados Genebank sob a referência J01949,
- do genoma do vírus SV40 tal como divulgado no banco de dados Genebank sob a referência J02400.

EXEMPLO 1: Geração de um adenovírus “atenuado” que compreende uma eliminação de uma parte da região de encapsidação.

1. Construção de um vector “atenuado” que compreende uma eliminação do nucleotido 184 ao nucleotido 273 da região de encapsidação

Constroi-se um vector que compreende

- a ITR 5' do genoma do Ad5 (do nucleotido 1 ao nucleotido 103),
- a região de encapsidação do Ad5 compreendida entre os nucleotidos 104 a 458 na qual a porção que vai do nucleotido 184 ao nucleotido 273 é eliminada e a timina (T) em posição 176 é modificada numa

- citossina (C) a fim de criar um sítio de restrição (*Aat*II),
- uma cassete de expressão de um gene de interesse que compreende de 5' para 3' o MLP do Ad2 (nucleotídeos 5779 a 6038), os sítios de restrição *Kpn*I-*Xba*I-*Hind*III e *Bam*HI, o ADNc humano que codifica para a proteína CFTR, (a composição em ácidos aminados corresponde à sequência publicada por Riordan et al., 1989, Science, 245, 1066-1073; com exceção de uma valina em vez da metionina em posição 470), os sítios *Pst*I, *Xho*I e *Sa*I e , finalmente, o sinal de terminação da transcrição do vírus SV40 (nucleotídeos 2665 a 2538), e
 - o fragmento do genoma do Ad5 que se estende do nucleotídeo 3329 ao nucleotídeo 6241.

Num primeiro tempo, clona-se entre os sítios *Eco*RI e *Eco*RV do vector M13TG131 (Kieny et al., 1983, Gene, 26, 91-99) o fragmento *Eco*RI *Sma*I isolado de pMLP11. Esta construção é resultante de pMLP10 (Levrero et al., 1991, Gene, 101, 195-202) e difere do vector principal pela introdução de um sítio *Sma*I ao nível do sítio *Hind*III. Obtém-se o vector M13TG6501. Submete-se este último a uma mutagénese dirigida a fim de eliminar as sequências compreendidas entre os nucleotídeos 184 a 273 da região de encapsidação. Realiza-se a mutagénese dirigida por meio de um estojo comercial (Amersham) de acordo com as recomendações do fornecedor, e utiliza-se o oligonucleotídeo OTG4174 referido no identificador de sequência nº 1 (SEQ ID NO: 1). O vector mutado é designado por M13TG6502. Reintroduz-se a região de encapsidação assim eliminada sob a forma de um fragmento *Eco*RI-*Bgl*II, encontrando-se o sítio *Bgl*II franqueado por tratamento com

ADN polimerase de Klenow, no vector pMLP11 digerido por *EcoRI* e *SmaI*.

O vector obtido, pTG6500, é digerido parcialmente por *PstI*, tratado com a ADN polimerase do fago T4 e depois digerido por *PvuI*. Insere-se neste vector o fragmento *PvuI-HpaI* isolado de pTG5955 (derivado de pMLP11). Este fragmento comporta o sinal de terminação da transcrição do vírus SV40 e a parte do genoma do Ad5 que se estende do nucleotido 3329 ao nucleotido 6241. O vector pTG6505 assim gerado é digerido parcialmente por *SphI*, tratado com a ADN polimerase do fago T4 e religado, isto a fim de destruir o sítio *SphI* situado em 5' do poliligador. Daí resulta o pTG6511, no qual se clona, após digestão com *BamHI* e tratamento com a ADN polimerase de Klenow, o ADNc CFTR humano sob a forma de um fragmento com extremidades franqueadas gerado por digestão *XhoI* e *AvaI* e tratamento com a ADN polimerase de Klenow. Obtém-se o pTG6525. A título indicativo, isola-se o ADNc CFTR de um plasmídeo da técnica anterior, tal como o pTG5960 (Dalemans e al., 1991, Nature, 354, 526-528).

2. Construção de um vector "atenuado" que compreende uma eliminação do nucleotido 270 ao nucleotido 346 da região de encapsidação.

Submete-se o vector M13TG6501 a uma mutagénese dirigida que utiliza o oligonucleotido OTG4173 (SEQ ID NO: 2). Volta a introduzir-se depois o fragmento mutado em pMLP11, tal como indicado anteriormente, para gerar o vector pTG6501. Este último é digerido por *SphI*, tratado com a ADN polimerase do fago T4 e depois com *PvuI*. Obtém-se o pTG6546 (Figura 2) por clonagem do fragmento *PvuI-KpnI* (tendo o sítio *KpnI* sido tornado franco) isolado de pTG6525 e comportando o ADNc CFTR humano.

738

3. Construção de um vector "atenuado" que compreende uma eliminação do nucleotido 287 ao nucleotido 358 da região de encapsidação.

Submete-se o vector M13TG6501 a uma mutagénese dirigida a fim de eliminar as sequências compreendidas entre os nucleotidos 287 e 358 da região de encapsidação e modificar as timinas em posição 275 e 276 em guaninas para introduzir um sítio *NcoI*. Realiza-se a mutagénese por meio do oligonucleotido OTG4191 (SEQ ID NO: 3) para se obter o M13TG6507. Cinde-se este último com *BhII*, trata-se com a ADN polimerase de Klenow, depois digere-se com *EcoRI* e purifica-se o fragmento correspondente mutado que se introduz em pMLP11 digerido com *EcoRI* e *SmaI*. Gera-se o pTG6504, do qual se isola o fragmento *SphI* (sítio tornado franco por tratamento com a ADN polimerase do fago T4)-*PvuI* que se insere entre os sítios *KpnI* (tornado franco por tratamento com a T4 polimerase) e *PvuI* de pTG6511. Obtém-se o pTG6513 que é tratado com *BamHI* e a ADN polimerase de Klenow antes de inserir o fragmento *AvaI* e *XhoI* de pTG5960 para se obter o pTG6526.

4. Geração de um adenovírus recombinante defectivo e atenuado.

Geram-se os adenovirus defectivos recombinantes por co-transfecção nas células 293 de ou pTG6525, pTG6526 ou pTG6546 linearizado por *Clal* e de ADN genómico do Ad-dl324 (Thimmappaya et al., 1982, Cell, 31, 543-551) igualmente digerido por *Clal*, de maneira a gerar um vírus recombinante por recombinação homóloga. Decorridos 8 a 10 dias, isolam-se as regiões individuais, ampliam-se nas células 293 e analisam-se por cartografia de restrição. Constituem-se lotes virais (AdTG6525, AdTG6526 e AdTG6546) e determina-se o

ZS

seu título de acordo com técnicas convencionais.

Coloca-se o vírus AdTG6546 em situação de competição por co-infecção com o AdCFTR (Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68, 143-155) que comporta uma região de encapsidação de tipo selvagem. Infectam-se as células 293 com 5 ufp (unidade que forma regiões) de Ad-CFTR e 5 ufp de AdTG6546 por célula. Isola-se em paralelo o ADN viral total pelo método de Hirt (Gluzman et Van Doren, 1983, J. Virol., 45, 91-103) e encapsida-se o ADN viral após tratamento das células com 0,2% de desoxidrolato e depois com 10 µg/ml de desoxiribonuclease (DNase) I, para eliminar os ADN não protegidos nos viriões. Muito embora a quantidade de ADN total de Ad-CFTR e de AdTG6546 seja idêntica, há cerca de 3 vezes menos de ADN de AdTG6546 do que de ADN de Ad-CFTR encapsitado.

Mede-se o nível de expressão da proteína CFTR nos extractos celulares de células 293 infectadas com AdTG6546. Efectua-se a análise por Western blot (mancha de western) de acordo com a técnica descrita em Dalemans et al., (1991, Nature, *supra*) utilizando o anticorpo monoclonal MATG1031. No entanto, pode utilizar-se qualquer outro anticorpo que reconheça epitopes antigénicos da proteína CFTR. Recolhe-se um produto com uma massa molecular esperada de cerca de 170 kDA. A título indicativo, o nível de produção é aproximadamente equivalente ao obtido nos extractos celulares infectados com o vírus não atenuado Ad-CFTR.

EXEMPLO 2: Geração de um adenovírus defectivo eliminado da região E1A e da totalidade das sequências que codificam para as proteínas precoces da região E1B.

1. Obtenção de um adenovírus recombinante para a expressão da proteína CFTR (AdTG6581).

Gera-se um tal adenovírus a partir de um vector plasmídico pTG6581 que compreende de 5' para 3':

- a ITR 5' do Ad5 (dos nucleotídeos 1 a 103),
- a região de encapsidação do Ad5 (dos nucleotídeos 104 a 458),
- uma sequência nucleotídica exógena que comporta uma cassette de expressão, a qual compreende os elementos seguintes:
 - o MLP do Ad2 (nucleotídeos 5779 a 6038), seguido por três líderes tripartidos igualmente do Ad2 (nucleotídeos 6039-6079; nucleotídeos 7101-7175, nucleotídeos 9637-9712); estes líderes são incluídos a fim de aumentar a eficácia de tradução das sequências inseridas a jusante,
 - um poliligador que compreende de 5' para 3' os sítios de restrições *Xba*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RV, *Hpa*I e *Not*I utilizáveis para a clonagem de um gene de interesse,
 - um gene de interesse, como o gene que codifica para a proteína CFTR,
 - o sinal de terminação da transcrição isolado do vírus SV40 (nucleotídeos 2543 a 2618),
- a porção do genoma adenoviral do Ad5 que vai dos nucleotídeos 4047 a 6241.

O fragmento do genoma do Ad5 que se estende do nucleotídeo 4047 ao nucleotídeo 4614 é amplificado por PCR a partir do ADN genómico do Ad5. A reacção PCR utiliza o iniciador de sentido OTG5021 (SEQ ID NO: 4) que

compreende na sua extremidade 5' um sítio *Bam*HI destinado a facilitar as etapas de clonagem ulteriores, e o iniciador anti-sentido OTG5157 (SEQ ID NO: 5). Trata-se o fragmento assim gerado com ADN polimerase de Klenow, antes de ser clonado no sítio *Sma*I de M13mp18 (Gibco BRL), dando lugar ao M13TG6517. A sequência do fragmento gerado por PCR é verificada de acordo com o método enzimático clássico (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463).

Por outro lado, isola-se o fragmento *Pvu*I-*Sma*I a partir de pMLP11. Clona-se entre os sítios *Pvu*I e *Kpn*I de pTG6511 (exemplo 1.1), tendo o sítio *Kpn*I sido franqueado por um tratamento com ADN polimerase do fago T4, de acordo com métodos convencionais. Gera-se assim o vector pTG6547.

Digere-se este último pelas enzimas *Sal*I e *Bst*XI e liga-se a dois fragmentos, por um lado o fragmento *Bam*HI-*Bst*XI purificado de M13TG6517 e, por outro lado, o fragmento *Xho*I-*Bgl*II de pTG6185. Este último compreende em especial o sinal de terminação da transcrição do vírus SV40 enquadrado pelos sítios de restrição *Xho*I e *Bgl*II. No entanto, poderia ser utilizado qualquer outro plasmídeo que comportasse a mesma sequência de terminação e sítios de restrição adequados. Obtém-se o vector pTG6555, no qual se insere no sítio único *Bam*HI um adaptador que contém dois sítios de restrição que geram extremidades franqueadas, *Eco*RV e *Hpa*I. Este adaptador provém da reassociação dos oligonucleotídeos OTG5564 e OTG5565 (SEQ ID NO: 6 e 7). Obtém-se o pTG6580. Finalmente, o fragmento *Sac*I-*Pst*I de pTG6525 cujas extremidades foram franqueadas e que comportam o ADNc CGTR humano, é clonado no sítio *Eco*RV de pTG6580. Gera-se o pTG6581 (Figura 3).

O adenovírus recombinante correspondente ao AdTG6581 é gerado por co-transfecção de pRG6581 e Ad dl324 cindidos por *Cla*I numa linha de complementação para a função E1, como a linha 293 ou uma linha do exemplo 6, de acordo com o protocolo clássico.

2. Obtenção de um adenovírus recombinante para a expressão do $IFN\gamma$.

Obtém-se o vector pTG6303 (Figura 4) por clonagem no sítio *Hpa*I de pTG6580 do fragmento *Hpa*I-*Sma*I de M13TG2437. Este último provém da clonagem num vector M13TG130 (Kieny et al., 1983, *supra*) do gene que codifica para o interferão gama ($IFN\gamma$) cuja sequência é tal como especificada em Gray et al. (1982, *Nature*, 295, 503-508). Obtém-se o adenovírus recombinante AdTG6303 de acordo com as técnicas clássicas por recombinação homóloga que resulta da co-transfecção de pTG6303 e do Ad dl324 linearizado por *Cla*I numa linha de complementação para a função E1.

3. Construção de um adenovírus de que foi eliminada a região E1 e no qual a região E3 se encontra colocada sob o controlo de um promotor constitutivo.

Obtém-se o vector pTG1670 mediante clonagem entre os sítios *Aat*II e *Bam*HI do vector polIII (Lathe et al., 1987, *Gene* 57, 193-201) de um fragmento PCR que comporta o LTR3' (Long Terminal Repeat) do vírus RSV (Rous Sarcoma Virus). A reacção PCR utiliza o vector pRSV/L (De Wet et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737) a título de matriz e os iniciadores OTG5892 e OTG5893 (SEQ ID NO: 8 e 9).

Além disso, a parte 5' da região E3 (nucleotídeos 27588 a 28607) é amplificada por PCR a partir do vector pTG1659 e por meio dos iniciadores OTG5920 e OTG5891 (SEQ ID NO: 10 e 11). Este último é construído em várias etapas. Obtém-se o fragmento *Bam*HI-*Avr*II (nucleotídeos 21562 a 28752) do ADN genómico de Ad5 e depois clona-se entre os mesmos sítios de pTG7457 para gerar o pTG1649. O vector pTG7457 é um pUC19 (Gibco BRL) modificado ao nível do polilíngador de modo a conter em especial um sítio *Avr*II. Depois introduz-se o fragmento *Eco*RI (Klenow)-*Avr*II de M13TG1646 (exemplo 8) em pTG1649 cindido por *Avr*II-*Nde*I (Klenow), o que dá o vector pTG1651. Finalmente, gera-se o pTG1659 pela inserção do fragmento *Avr*II (nucleotídeos 28752 a 35463) purificado do ADN genómico de Ad5 em pTG1651 linearizado por *Avr*II. O fragmento PCR é integrado entre os sítios *Xba*I e *Bam*HI e p poli II, para se obter o pTG1671. Insere-se em seguida no sítio *Aat*II deste último, um fragmento *Eco*RV-*Aat*II obtido a partir de pTG1670, para se obter o pTG1676.

Isola-se o fragmento *Eco*RI do Ad5 que corresponde aos nucleotídeos 27331 a 30049, a partir de uma preparação de ADN genómico e sub-clona-se em pBluescript-Sk+ (Stratagene) previamente cindido por *Eco*RI. Obtém-se o pTG1669. Muta-se esta último (estojo de Amersham) mediante introdução de um sítio *Bam*HI quer em posição 27867 (oligonucleotídeo mutagénico OTG6079; SEQ ID NO: 12) ou em posição 28249 (oligonucleotídeo mutagénico OTG6080; SEQ ID NO: 13). Obtém-se respectivamente pTG1672 e pTG1673. Isola-se o vector pTG1676, o fragmento *Bam*HI-*Bsi*WI que comporta o LTR 3' de RSV, seguido pela parte 5' da região E3 e insere-se entre os sítios *Bam*HI (posição 27331 ou 30049) e

Bst/W (posição 28390) dos vectores obtidos na etapa anterior para gerar pTG1977 e pTG1978. Depois, integra-se o fragmento *Eco*RI obtido de cada um destes dois vectores em pTG1679, substituindo o fragmento *Eco*RI selvagem. Obtém-se pTG1679-E3+. A título indicativo, o vector pTG1679 resulta da clonagem do fragmento *Bst*EII-*Kpn*I (sítio tornado franco por tratamento com a T4 polimerase) de pTG6590 (exemplo 3.1) entre os sítios *Bst*EII-*Bam*HI (sítio tornado franco por tratamento com a Klenow polimerase) de pTG6584 (exemplo 3.1).

Produz-se uma partícula de adenovírus mediante recombinação homóloga numa linha de complementação para a função E1, entre o fragmento *Aat*II de pTG1679-E3+ e um vector adenoviral tal como o Ad dl324 ou Ad-RSV β -gal. Este último contém o gene da β -galactosidase em vez da região E1 (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest., 90, 626-630).

Exemplo 3: Construção de um vector adenoviral recombinante com capacidade de clonagem melhorada por eliminação parcial das regiões E1 e E3.

1. Construção de pTG6590 Δ E3

Amplifica-se o fragmento que comporta a parte do genoma do Ad5 compreendida entre os nucleotidos 27325 e 27871 por PCR a partir de uma preparação de ADN genómico de Ad5 e por meio dos iniciadores OTG6064 e OTG6065 (SEQ ID NO: 14 e 15). O OTG6065 compreende na sua extremidade 5' um sítio *Bsm*I, igualmente presente na região E3 (em posição 30750).

Clona-se o fragmento amplificado no sítio *Sma*I de M13mp18, para se obter o M13TG6523. Isola-se o fragmento *Eco*RI-*Bsm*I a partir deste último para ser introduzido no vector pTG6590 cindido pelas mesmas enzimas. Obtém-se o

pTG6590Δ3, o qual contém a parte 3' do genoma adenoviral (nucleotídeos 27082 a 35935) de que foi eliminada a região E3 compreendida entre os nucleotídeos 27872 e 30740, enquanto que do pTG6590 se eliminou uma parte mais pequena da região E3 (posição 28592 a 30470). Obtém-se o vector pTG6590 da maneira seguinte: produz-se por PCR um fragmento que se estende dos nucleotídeos 35228 a 35935 (comportando a ITR 3') a partir de uma preparação genómica de Ad5 e por meio dos iniciadores OTG5481 e OTG5482 (SEQ ID NO: 16 e 17). Este último é, seguidamente, clonado no sítio *Sma*I de M13mp18 para se obter o M13TG6519. Por outro lado, vector pTG6584 é digerido por *Xba*I e depois religado a fim de eliminar o fragmento correspondente da região E3. Obtém-se o pTG6589, que é cindido por *Bam*HI, tratado com Klenow e depois digerido por *Bst*EII. Introduz-se no vector assim tratado o fragmento *Eco*RI (Klenow)-*Bst*EII purificado de M13TG6519, para gerar pTG6590.

A título indicativo, o vector pTG6584 é um vector pUC19 (Gibco BRL) que contém as sequências de Ad5 que se estendem do sítio único *Spe*I (posição 27082) até ao início da região promotora da região E4 (posição 35826). É obtido mediante digestão de pTG1659 (exemplo 2.3) por *Sal*I e *Spe*I, tratado com ADN polimerase de Klenow e depois religação.

2. Construção de um vector adenoviral de que foi eliminada a região

E1 e a parte de E3 que não exprime a proteína gp19kDa

Obtém-se a parte da região E3 do Ad5 que codifica para a gp19kDa (nucleotídeos 28731 a 29217) por PCR a partir de uma preparação de ADN genómico de Ad5 utilizando os iniciadores OTG5455 e OTG5456 (SEQ ID NO: 18 e 19).

Introduz-se o fragmento gerado no sítio *Sma*I de M13mp18 para se obter o M13TG6520. Isola-se o fragmento *Eco*RI-*Xba*I a partir deste último, que se clona no sítio *Aat*II de pTG1670 (exemplo 2.3), tendo os sítios sido tornados francos por tratamento com ADN polimerase de Klenow. Em seguida, insere-se o fragmento *Xba*I purificado do vector da etapa anterior no sítio *Xba*I do vector pTG6590ΔE3 (exemplo 3.1)

3. Obtenção de partículas adenovirais.

Obtêm-se as partículas virais recombinantes mediante ligação dos fragmentos *Spe*I isolados do ADN genómico de AdTG6303 ou AdTG6581 e de um ou de outro dos vectores dos exemplos 3.1 e 3.2. Em seguida, transfecta-se a mistura de ligação numa linha de complementação para a função E1.

EXEMPLO 4: Construção de um adenovírus de que se eliminaram as regiões E1 e E4.

Amplificam-se as partes do genoma adenoviral que se estendem dos nucleótidos 31803 a 32799 e 35827 a 35935 a partir de uma preparação de ADN genómico de Ad5 e de iniciadores OTG5728 e OTG5729 (SEQ ID NO: 20 e 21) e OTG5730 e OTG 5481 (SEQ ID NO: 22 e 16) respectivamente. Após uma dezena de ciclos de ampliação, prossegue-se a reacção a partir de uma alíquota das duas misturas reaccionais e utilizando os oligonucleotidos OTG5728 e OTG5781. O fragmento amplificado estende-se dos nucleotidos 31803 a 35935 com uma eliminação da totalidade da região E4 (posições 32800 a 35826). Após digestão com *Eco*RI e *Hind*III, clona-se entre os mesmos sítios de M13mp18 para se obter M13TG6521.

Digere-se o M13TG6521 com *EcoRI*, trata-se com a ADN polimerase de Klenow e depois cinde-se com *BstXI*. Insere-se o fragmento de 0,46 kb que comporta a ITR 3' entre o sítio *BamHI* franqueado por tratamento com ADN polimerase de Klenow e o sítio *BstXI* de pTG6584 (exemplo 3.1). Obtém-se o pTG6587, que se digere com *XbaI* e depois se religa sobre si mesmo, para depois se obter o pTG6588 (eliminação de E3).

Introduz-se no sítio *PacI* de pTG6588 um fragmento de ADN sintético que provém da reassociação dos oligonucleótidos OTG6060, OTG6061, OTG6062 e OTG6063 (SEQ ID NO: 23 a 26). Daí resulta o pTG8500 no qual os sinais de terminação de transcrição dos genes tardios L5 são melhorados.

Gera-se uma partícula adenoviral (Ad Δ E4) cujo genoma é eliminado da totalidade da região E4 (nucleotidos 32800 a 35826) e do fragmento *XbaI* da região E3 (nucleotidos 28592 a 30470), por ligação dos fragmentos *SpeI* isolados de pTG8500 ou pTG6588 do Ad5. Transfecta-se a mistura de ligação numa linha celular de complementação para a função E4, por exemplo a linha W162 (Weinberg e Ketner, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5383-5386). Obtém-se um adenovírus defectivo para as funções E1 e E4 (Δ E1, Δ E4) por transfecção numa linha de complementação para E1 e E4 (por exemplo a linha do exemplo 8) da mistura de ligação entre o genoma do Ad dl324 e o plasmídeo pTG8500 ou pTG6588 linearizado por *SpeI*.

Por outro lado, pode-se proceder igualmente da maneira seguinte. Clona-se o fragmento *SpeI-ScaI* isolado de pTG1659 (exemplo 2,3) no vector pTG6588 cindido por essas mesmas enzimas, para se obter o pTG6591. Este último

comporta as sequências do Ad5 dos nucleótidos 21062 a 35935 mas, tal como anteriormente, de que foram eliminadas a totalidade da região E4 e do fragmento *Xba*I da região E3. Introduz-se no vector pTG6591 digerido por *Pac*I, o fragmento de ADN sintético descrito anteriormente e gera-se o pTG6597. As partículas adenovirais podem ser obtidas por recombinação homóloga entre o ADN genómico do Ad dl324 cindido por *Spe*I e os plasmídeos pTG6591 ou pTG6597 cindido por *Bam*HI.

Exemplo 5: Construção de um vírus “mínimo”

Um vector adenoviral dito “mínimo” é constituído por clonagem num plasmídeo dos elementos seguintes:

- a ITR 5' do Ad5 (dos nucleotidos 1 a 103);
- a região de encapsidação do Ad5 (dos nucleotidos 104 a 458);
- uma sequência nucleotídica exógena que compreende:
 - um primeiro gene de interesse terapêutico colocado de preferência sob o controlo do seu próprio promotor para se obter uma regulação da expressão mais próxima possível da regulação natural,
 - um segundo gene de interesse constituído pelo gene TK-HSV-1, e
 - de maneira facultativa, sequências nucleotídicas quaisquer adicionadas por razões de eficácia de replicação ou de encapsidação de maneira que o tamanho total do genoma a encapsidar se encontre compreendido entre 30 e 36kb;
 - as sequências que codificam para a proteína Gal4 de

Saccharomyces cerevisiae (Laughon e Gesteland, 1984, Mol. Cell. Biol., 4, 260-267) colocadas sob o controlo de um promotor funcional numa célula eucariota superior;
e

- a ITR 3' do Ad5 (dos nucleotidos 35833 a 35935).

Realiza-se a associação destes diferentes elementos de acordo com as técnicas convencionais de biologia molecular. A obtenção de viriões infecciosos que compreendem um tal vector tem lugar conforme descrito anteriormente numa linha de complementação do exemplo 7.

EXEMPLO 6: Constituição de uma célula de complementação susceptível de complementar *en trans* a função E1.

1. Constituição de uma célula de complementação que compreende a região E1 dos nucleotidos 100 a 5297 (pTG6533)

Esta comporta:

- uma cassette de expressão do gene pac, o qual se encontra colocado sob o controlo do promotor precoce do virus SV40 (nucleotidos 5171 a 5243) e compreende em 3' o sinal de terminação da transcrição de SV40 (nucleotidos 2543 a 2618). O gene pac utilizado corresponde a um fragmento que vai do nucleotido 252 ao nucleotido 905 da sequência divulgada por Lacalle et al. (1989, Gene, 79, 375-380) e que comporta quatro mutações em relação à sequência publicada (C em posição 305 substituído por A; C em posição 367 substituído por T; inserção de um G em posição 804; eliminação de um G em

posição 820),

- um fragmento do genoma do Ad5 que vai dos nucleotídeos 100 a 5297. Este fragmento compreende as regiões E1A e E1B munidas do seu próprio promotor e do seu sinal de terminação da transcrição assim como de uma fracção da região E2, cobrindo assim as sequências que codificam para a proteína IX – A título indicativo, parece que a linha 293 não é capaz de produzir uma proteína IX funcional.

Realiza-se a construção em diversas etapas pormenorizadas a seguir. Submete-se o vector p poliIII-I* (Lathe et al., 1987, Gene, 57, 193-201) a uma digestão pelas enzimas *AccI* e *EcoRI*. Clona-se no vector assim tratado o fragmento *EcoRI*-*Clal* isolado do plasmídeo pTG6164. Obtém-se o vector pTG6528.

O plasmídeo pTG6164 é resultante de pLXSN (Miller D, 1989, Bio/Techniques, 7, 980) e compreende o gene *pac* colocado sob o controlo do promotor precoce do vírus SV40. Resumidamente, introduz-se o fragmento *HindIII*-*KpnI* de pLXSN em M13TG131 para produzir M13TG4194. Insere-se neste último, digerido por *NheI* e *KpnI*, o fragmento *NheI*-*KpnI* de pMPSV H2 K IL2R (Takeda et al., 1988, Growth Factors, 1, 59-66) para produzir M13TG4196. Digere-se este último com *HindIII*-*KpnI* e clona-se o fragmento resultante de uma digestão *HindIII* e de uma digestão parcial *KpnI* e purifica-se a partir de pLXSN. Obtém-se o pTG5192. Digere-se este último com *HindIII* e parcialmente com *NheI* e introduz-se o fragmento *HindIII*-*NheI* de pBabe Puro (Land et al., 1990, Nucleic Acids Res., 18, 3587), dando lugar ao pTG6164.

Digere-se o vector pTG6528 com *Pst*I e introduz-se ao nível deste sítio o fragmento *Pst*I isolado de Ptg6185 (exemplo 2.1) que comporta o sinal de terminação da transcrição de SV40. Obtém-se o pTG6529. Submete-se este último a uma digestão *Eco*RI-*Hpa*I e liga-se com dois fragmentos, por um lado um fragmento *Bsp*EI-*Bcg*I (posições 826 a 5297) purificado do ADN genómico de Ad5 e por outro lado um fragmento gerado por PCR nas extremidades *Eco*RI e *Bsp*EI, para se obter o pTG6531. Gera-se o fragmento PCR mediante amplificação genética a partir de ADN genómico do Ad5 e de iniciadores OTG4564 e OTG4565 (referido nas SEQ ID NO: 27 e 28). O fragmento amplificado é digerido pelos enzimas *Eco*RI e *Bsp*EI e posto em ligação conforme indicado no parágrafo anterior.

O vector pTG6531 compreende as duas unidades de transcrição (a da região EI e a do gene pac) na mesma orientação. Para evitar interferências ao nível da transcrição, coloca-se numa orientação de cabeça para baixo (inverso um em relação ao outro) tratando o pTG6531 com *Bam*HI e religando-os. O vector pTG6533 corresponde a um clone que apresenta a orientação inversa das duas unidades.

Transfecta-se o vector pTG6533 numa linha celular mamífera, por exemplo a linha Vero (ATCC, CCL81) ou A549 (ATCC, CCL185) pela tecnologia do fosfato de cálcio. Cultivam-se as células transfectadas de acordo com as recomendações do fornecedor e colocam-se 24 horas após a transfecção em meio selectivo que contém puromicina (concentração 6 µg/ml). Escolhe-se os clones resistentes sobre os quais se avalia a expressão do genes da região EI a fim de determinar o clone mais produtor, que poderá ser utilizado a título de linha de

complementação para a preparação de um adenovírus defectivo para a função E1, tal como o pormenorizado no exemplo 2.

Analisa-se a expressão das sequências que codificam para as proteínas precoces da região E1 por Northern blot (mancha de Northern) utilizando sondas apropriadas marcadas com o isótopo ^{32}P . Detecta-se a produção de proteínas codificadas pela região E1A mediante imunoprecipitação após marcação das células com o isótopo ^{35}S e por meio de um anticorpo comercial (Oncogene Science Inc., referência DP11).

Pode-se verificar igualmente a capacidade dos produtos de expressão da região E1A para activar o promotor da região E1B (por análise dos ARNm E1B por Northern blot) ou para activar o promotor da região E2 (por dosagem da actividade enzimática após transfecção transitória de um plasmídeo “relator” que compreende o gene CAT (Cloranfenicol Acetil Transferase) colocado sob o controlo do promotor E2).

Finalmente, pode-se infectar essas células pelo Ad-RSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., 1992, *supra*) e titular o vírus pela técnica agar logo que se observa um efeito citopático. De uma maneira geral, procede-se da maneira seguinte: infectam-se as células com uma taxa (multiplicidade de infecção) igual a 10. Cerca de 48 horas após a infecção, sendo o efeito citopático visível, cinde-se as células e doseia-se a actividade da β -galactosidade de acordo com o protocolo convencional (veja-se por exemplo Maniatis et al., 1989, *supra*). Os clones positivos são reinfectados com uma taxa mais baixa. 48 horas após a infecção, recolhe-se o sobrenadante e as células de acordo com as técnicas clássicas.

Determina-se o título viral pelo método sob agar utilizando células 293. A razão do título obtido para o título inicial constitui o factor de amplificação.

2. Construção de uma linha celular de complementação que compreende a região E1 dos nucleotídeos 505 a 4034 (pTG6557, pTG6558, pTG6559, pTG6564 e pTG6565)

Os vectores pTG6557, pTG6558 e pTG6559 compreendem:

- (i) uma cassette de expressão do gene pac (nucleotídeos 252 a 905 como anteriormente) sob o controlo:
 - do promotor E2A do Ad2 (nucleotídeos 27341 a 27030) (em pTG6558),
 - do promotor E2A do Ad2 de que eliminaram sequências compreendidas entre os nucleotídeos 27163 a 27182 (para pTG6557).
Uma tal mutação permite diminuir o nível de base do promotor E2A, sem afectar a indutibilidade pela proteína trans-activadora codificada por E1A, ou
 - do promotor precoce SV40 para pTG6559.

Nos três casos, ela comporta igualmente em 3' o sinal de terminação da transcrição do vírus SV40 (nucleotídeos 2543 a 2618); e

- (ii) uma cassette de expressão que comporta a parte da região E1 do Ad5 que vai dos nucleótidos 505 a 4034. Esta porção do genoma adenoviral contém a totalidade das sequências que codificam para as proteínas precoces da região E1A, o sinal de terminação da transcrição da unidade E1A, o promotor E1B (induzível pela

proteína trans-activadora codificada por E1A) e a totalidade das sequências codificadoras da região E1B. Ela inclui igualmente as sequências que codificam para a proteína IX, que se sobrepõem à região E1B. No entanto, ela encontra-se desprovida do promotor da região E1A e do sinal de terminação da transcrição das unidades transcricionais E1B e IX. A fim de permitir a expressão das sequências da região E1, introduz-se 5' do fragmento adenoviral, o promotor do gene murino PGK e em 3' o sinal de terminação da transcrição do gene β -globina de coelho (nucleotídeos 1542 a 2064 da sequência divulgada no banco de dados Genbank sob a referência K03256).

De maneira facultativa, pode-se igualmente introduzir sequências nucleotídicas quaisquer, por exemplo isoladas de pBR322 (Bolivar et al., 1977, *Gene*, 2, 95-113), entre as cassetes de expressão do gene pac e da região E1, a fim de evitar eventuais interferências transcricionais.

A construção desses vectores efectua-se em diversas etapas referidas abaixo.

Em primeiro lugar, amplia-se por PCR a parte do genoma do Ad5 que vai do nucleotídeo 505 ao nucleotídeo 826 a partir de uma preparação genómica e dos iniciadores OTG5013 que compreende em 5' um sítio *Pst*I útil para as etapas de clonagem ulteriores (SEQ ID NO: 29) e OTG4565 que se sobrepõem ao sítio *Bsp*E1 (SEQ ID NO: 28). Trata-se o fragmento gerado por PCR com ADN polimerase de Klenow, e depois introduz-se no sítio *Sma*I de M13mp18 dando lugar ao

M13TG6512. Verifica-se a sequência do fragmento PCR.

Digere-se o vector pTG6533 (exemplo 6.1) pelas enzimas *EcoRI* e *BspEI*. Liga-se o vector assim tratado com, por um lado, o fragmento *PstI-BspEI* isolado de M13TG6512 e, por outro lado, o fragmento *EcoRI-PstI* isolado de pKJ-1. Este último compreende a porção do promotor do gene murino PGK, entre os nucleótidos -524 e -19, cuja sequência se encontra referida em Adra et al. (1987, *Gene*, 60, 65-74). Esta etapa dá lugar ao pTG6552 e permite inserir o promotor do gene murino PGK a montante da região E1 do Ad5 com início no nucleotido 505.

Além disso, purifica-se o *XhoI-BamHI*, cuja extremidade gerada por *XhoI* foi franqueada a seguir ao tratamento com a ADN polimerase de Klenow, a partir de pBCMG Neo (Karasuyama et al., 1989, *J. Exp. Med.*, 169, 13-25). Introduz-se este fragmento, que compreende o sinal de terminação da transcrição do gene β -globina de coelho entre os sítios *SmaI* e *BamHI* do vector p poliII-Sfi/Not-14* (Lathe et al., 1987, *Gene*, 57, 193-201). O vector pTG6551 que resulta, é por sua vez, digerido pelas enzimas *SphI* e *EcoRV* a fim de aí inserir um fragmento do genoma do Ad5 que vai do nucleotido 3665 ao nucleotido 4034. Este fragmento é gerado por PCR de acordo com o protocolo convencional. Utiliza-se uma preparação de ADN genómico de Ad5 a título de matriz e os iniciadores OTG5015 que cobrem o sítio interno *SphI* em posição 3665 (SEQ ID NO: 30) e OTG 5014 que compreende em 5' um sítio *BglII* (SEQ ID NO: 31).

Trata-se o fragmento PCR com ADN polimerase de Klenow antes de ser clonado num sítio *SmaI* de M13mp18, que gera o M13TG6516. Após verificação da sua sequência, o fragmento PCR é isolado por digestão com *BglII*, tratamento com

ADN polimerase de Klenow e digestão com *SphI*. Insere-se entre os sítios *SphI* e *EcoRV* de pTG6551. Daí resulta o pTG6554.

Por outro lado, submete-se o vector pTG6529 (exemplo 6.1) a uma digestão com as enzimas *HpaI* e *HindIII*. Purifica-se o fragmento de 2,9 kb que comporta o gene pac seguido pelo sinal de terminação da transcrição do vírus SV40. Liga-se este último ao fragmento *SmaI-HindIII* isolado de pE2 Lac (Boeuf et al., 1990, Oncogene, 5, 691-699) que suporta o promotor E2A do Ad2. Obtém-se o vector pTG6556. De maneira alternativa, pode ser ligado ao fragmento *SmaI-HindIII* isolado de pE2 Lac D9170 (Zajchowski et al., 1985, EMBO J., 4, 1293-1300) que comporta o promotor E2A mutado do Ad2. Obtém-se, nesse caso, o pTG6550.

Digere-se o pTG6556 pelas enzimas *EcoRI* e *BamHI*. Insere-se entre estes sítios o fragmento *EcoRI-SacII* isolado de pTG6552 e o fragmento *SacII-BamHI* isolado de pTG6554. Obtém-se o vector pTG6558. A mesma etapa realizada sobre pTG6550 e pTG1643 (exemplo 7.1) gera pTG6557 e pTG6559, respectivamente.

Digerem-se pTG6557 e pTG6558 com *EcoRV*, sítio único situado entre as duas cassetes de expressão (gene pac e região E1). Clona-se nesse sítio um fragmento *EcoRV-PvuII* de 1,88kb isolado de pBR322 (Bolivar et al., *supra*) a fim de afastar os dois promotores. Geram-se respectivamente pTG6554 e pTG6565.

Os vectores pTG6557, pTG6558, pTG6559, pTG6564 e pTG6565 são transfectados na linha celular A549. Tal como anteriormente, escolhem-se os clones que resistem a puromicina e verifica-se a expressão da região E1. Os clones que

exprimem E1 destinam-se a amplificar e propagar adenovírus defectivos para a função E1. A produção dos produtos de expressão E1 é acompanhada por um efeito citotóxico mas a análise de Southern não permite evidenciar rearranjos de vectores. Após transfecção pelo Ad-RSV- β gal, vários clones são susceptíveis de amplificar o vírus de um factor superior a 100.

3. Construção de uma célula de complementação induzível pela proteína Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Estes vectores compreendem, tal como anteriormente, a parte da região E1 do Ad5 que vai do nucleotido 505 ao 4034. No entanto, a expressão das sequências da região E1A é colocada sob o controlo de um promotor induzível constituído por um lado pelo promotor mínimo MLP de Ad2 (TATA box e sinal de iniciação de transcrição; nucleotidos -34 ao +33) e por outro lado por uma sequência de activação do gene Gal 10 activável pela proteína Gal4. A sequência de consenso de activação de 17 nucleotidos (17MX), que corresponde ao sítio de fixação de Gal4 é especificada em Webster et al. (1988, Cell, 52, 169). O sinal de terminação da transcrição do gene da β -globina de coelho é colocado em 3' da unidade transcripcional E1B.

Sintetiza-se um primeiro fragmento de ADN que compreende um dímero da sequência 17MX (SEQ ID NO: 32 e 33) seguida do promotor mínimo MLP de Ad2 e munido na sua extremidade 5' de um sítio *SalI* e na sua extremidade 3' de um sítio *BamHI*. Franqueia-se o sítio *SalI* mediante tratamento com ADN polimerase de Klenow. Além disso, sintetiza-se um segundo fragmento de ADN que compreende um pentâmero da sequência seguido do mesmo promotor e munido em

5' e 3' dos sítios *Xba*I e *Bam*HI. Após digestão com *Xba*I, franqueia-se a extremidade por tratamento com a polimerase de Klenow.

Introduz-se cada um destes fragmentos no sítio *Bgl*II de p poli II para produzir respectivamente pTG1656 e pTG1657. Em seguida, introduzem-se em cada um dos vectores previamente digeridos com *Pst*I-*Bam*HI, os dois fragmentos seguintes: o fragmento *Pst*I-*Xba*I isolado de pTG6552 (Exemplo 6.2) e o fragmento *Xba*I-*Bam*HI isolado de pTG6559 (exemplo 6.2). Obtém-se pTG1660 e pTG1661 respectivamente (Figura 5).

Co-transfectam-se as células A549 com pTG1643 (vector de expressão do gene pac) e quer pTG1660 ou pTG1661. Seleccionam-se os clones quanto à sua resistência à puomicina e estudam-se conforme indicado anteriormente. Cerca de 50% dos clones A549-1660 e A549-1661 produzem produtos de expressão da região E1. No entanto, a produção é acompanhada por um efeito citotóxico, que modifica o aspecto morfológico das células.

Verifica-se a integração e o não rearranjo dos plasmídeos no genoma celular por Southern. Não se pôde evidenciar qualquer modificação substancial dos plasmídeos integrados (pTG1643, pTG1660 e pTG1661) nos clones produtores analisados. Pode-se verificar igualmente a capacidade de indução da expressão das sequências codificadas pela região E1A na presença de Gal4 (por transformação com um plasmídeo que permita a expressão constitutiva da proteína Gal4).

Após a infecção de diversos clones produtores por Ad-RSV-Bgal numa razão de cerca de 2, os dois clones A549-1660 são susceptíveis de amplificar o lote viral de um factor superior a 100.

EXEMPLO 7: Constituição de uma linha celular de complementação para o conjunto das funções essenciais para a replicação de um adenovírus.

Construiu-se um vector que compreende o conjunto do genoma adenoviral do Ad5 com a excepção da ITR 5', da ITR 3' e da região de encapsidação.

Digere-se o vector pTG6528 (exemplo 6.1) com as enzimas *Pst*I e *Bgl*II entre as quais se insere um fragmento de ADN sintetizado quimicamente de acordo com o protocolo convencional constituído pelos oligonucleotidos dos OTG5039 e OTG5040 (SEQ ID NO: 34 e 35). A sequência dos oligonucleotidos é concebida de maneira a não reconstituir o sítio de clonagem *Pst*I e introduzir um sítio *Eco*RV. Obtém-se o pTG1639, o qual é linearizado mediante digestão com *Eco*RV e ligado a um fragmento *Xba*I-*Bam*HI cujas extremidades são franqueadas mediante tratamento com a ADN polimerase de Klenow. Este fragmento é portador do sinal de terminação da transcrição do vírus SV40. Pode utilizar-se nesta etapa qualquer plasmídeo que comporte um sinal rodeado pelos sítios de restrição adequados.

O vector pTG1640 assim produzido, é digerido por *Bam*HI e *Bhl*II e introduz-se o fragmento portador da cassette de expressão do gene pac no sítio *Bgl*II do vector pPolII-Sfi/Not-14*. Obtém-se o pTG1641. Lineariza-se este último com *Not*I e trata-se com a ADN polimerase de Klenow. Introduz-se o fragmento *Bam*HI-*Sa*I de 0,276 kb isolado de pBR322 (Bolivar et al., *supra*) igualmente tratado com a ADN polimerase de Klenow. Isto dá lugar ao pTG1643.

Lineariza-se o pTG1643 com *Xho*I e insere-se neste sítio um fragmento híbrido *Xho*I que comporta um dímero 17MX seguido pelo produtor mínimo do

gene TK-HSV-1 (nucleotidos 303 a 450 da sequência divulgada no banco de dados Genbank sob a referência V00467 e completada em 3' por um sítio *Xho*I). Obtém-se o pTG1647 no qual se insere o promotor híbrido 2x17MX-TK-HSV-1 com a mesma orientação que a cassete de expressão do gene *pac*.

Esta construção, pTG1647, serve de vector de base para introduzir entre os sítios *Pst*II e *Bam*HI um fragmento do genoma do Ad5 que vai do nucleotido 505 ao nucleotido 35826. Num primeiro tempo, digere-se o pTG1647 com *Pst*II e *Bam*HI e depois liga-se, por um lado, ao fragmento *Pst*II-*Cla*I de pTG6552 (exemplo 6.2) que comporta a parte do genoma de Ad5 dos nucleotidos 505 a 918 e, por outro lado, ao fragmento *Cla*I-*Bam*II (posições 918 a 21562) preparado a partir do ADN genómico do Ad5. O vector assim obtido comporta a parte 5' do Ad5 com excepção da ITR5' e da região de encapsidação.

Além disso, a parte 3' do genoma do Ad5 é associado no vector ppoliII-Sfi/Not-14*. Lineariza-se este último com *Bam*HI e introduz-se o fragmento *Bam*HI-*Avr*II (nucleotidos 21562 a 28752) do genoma do Ad5 e um fragmento PCR que corresponde aos nucleotidos 35463 a 35826 do Ad5. Produz-se este último a partir do ADN genómico do Ad5 e dos iniciadores OTG5024 (SEQ ID NO: 36) e OTG5025 (SEQ ID NO: 37) e comporta em 5' um sítio *Bam*HI. Digere-se o vector obtido com *Avr*II e insere-se o fragmento *Avr*II isolado do ADN genómico do Ad5 que se estende das posições 28753 a 35462.

Introduz-se o fragmento *Bam*HI que comporta as sequências adenovirais no sítio *Bam*HI do vector da etapa anterior que comporta a parte 5' do genoma adenoviral desprovido da ITR 5' e da região de encapsidação.

Uma linha celular de complementação susceptível de complementar o conjunto das funções de um adenovírus defectivo é gerada por transfecção numa linha celular, tal como A549, de acordo com o protocolo descrito nos exemplos anteriores.

Pode-se proceder igualmente mediante construção de quatro vectores que comportam a quase totalidade do genoma adenoviral que será reunido num único vector quando da etapa final.

- pTG1665 corresponde à clonagem do fragmento *BspEI* (nucleotidos 826 a 7269) isolado de uma preparação de ADN genómico de Ad5, no sítio *XmaI* de p poli II-Sfi/Not-14*;
- pTG1664 é gerado pela inserção do fragmento *NotI* (nucleotidos 6503 a 1504) isolado de uma preparação de ADN genómico de Ad5, no sítio *NotI* do mesmo vector;
- pTG1662 é obtido por introdução do fragmento *AatII* (nucleotidos 10754 a 23970) isolado de uma preparação de ADN genómico de Ad5 no sítio *AatII* de ppolIII;
- pTG1659 que comporta a parte 3' do genoma de Ad5 (exemplo 2.3).

Introduz-se depois um fragmento que comporta um sistema de expressão induzível como o promotor descrito no exemplo 6.3 ou 7 induzível por Gal4 ou um promotor de técnica anterior como o promotor metalotionina ou tetraciclina. Coloca-se um tal fragmento a montante das sequências 5' do Ad5 (nucleotidos 505 a 918) no vector pTG1665 digerido por *AatII* e *ClaI*. Finalmente, clona-se sucessivamente no vector anterior e nos sítios correspondentes dos fragmentos *NotI*

de pTG1664, *Aat*II de pTG1662 e finalmente *Bam*HI de pTG1659.

Uma linha celular de complementação é gerada por co-transfecção do vector anterior e de pTG1643 e isolam-se os clones resistentes à puromicina. Esta linha é mais particularmente destinada a ampliar e encapsidar os vectores adenovirais do exemplo 5 defectivos para as funções E1, E2 e E4 e as funções tardias.

EXEMPLO 8: Constituição de uma linha celular de complementação para as funções E1 e E4.

Digere-se o vector pTG1647 (exemplo 7) pelas enzimas *Pst*I-*Bam*HI e introduzem-se no vector assim tratado três fragmentos:

- o fragmento *Pst*I-*Xba*I de pTG6552 (exemplo 6.2) que comporta as sequências de Ad5 do nucleotido 505 ao nucleotido 1339,
- o fragmento *Xba*I-*Psh*I de pTG6552 que comporta as sequências de Ad5 do nucleotido 1340 ao nucleotido 3665, e
- O fragmento *Sph*I-*Bam*HI de pTG6554 (exemplo 6.2) que comporta as sequências de Ad5 do nucleotido 3665 ao 4034 e um sinal de terminação da transcrição.

Corta-se o vector assim obtido mediante *Bam*HI e introduzem-se nesse sítio três fragmentos que são os seguintes:

- um fragmento digerido por *Bam*HI-*Afl*II produzido por PCR que corresponde à sequência do Ad5 situada entre as posições 32800 a 33104. Utiliza-se o ADN genómico de Ad5 como matriz e os iniciadores OTG5078 (SEQ ID NO: 38) e OTG5079 (SEQ ID NO:

39),

- o fragmento *AflII-AvrII* isolado do ADN genómico de Ad5 (nucleotidos 33105 a 35463),
- o fragmento *AvrII-BamHI* produzido pelo PCR por intermédio dos iniciadores OTG5024 e OTG5025 (ver exemplo 7).

Introduz-se o vector assim produzido numa linha celular de acordo com o protocolo descrito anteriormente, para constituir uma linha de complementação para as funções E1 e E4.

Além disso, uma tal linha pode ser igualmente obtida de acordo com o protocolo seguinte:

Reconstitui-se a região E4 do genoma do Ad5 (nucleotidos 32800 a 35826) em diversas etapas. Sintetiza-se a parte que vai dos nucleotidos 33116 a 32800 mediante PCR a partir do ADN genómico de Ad5 com o par de iniciadores OTG5078 e OTG5079 /SEQ ID NO: 38 e 39) e depois insere-se no sítio *EcoRV* de M13TG130, para gerar M13TG1645.

O fragmento *BamHI-AflII* deste último é utilizado numa reacção de ligação com o fragmento *AflII-AvrII* de Ad5 (nucleotidos 33104 a 35463) e o vector pTG7457 digerido por *BamHI* e *AvrII*. Obtém-se o pTG1650.

Depois completa-se a região E4 por obtenção do fragmento que corresponde aos nucleotidos 35826 a 35457 por PCR a partir de uma preparação de ADN genómico de Ad5 e dos iniciadores OTG5024 e OTG5025 (SEQ ID NO: 36 e 37). Insere-se este último no sítio *SmaI* de M13mp18 para se obter M13TG1646. Isola-se o fragmento *AvrII-EcoRI* a partir deste último e clona-se entre os sítios

AvrII e *EcoRI* de pTG1650. Obtém-se pTG1652.

Isola-se o fragmento *BamHI* que comporta a região E4 de Ad5 de pTG1652 e clona-se no sítio *BamHI* de pTG1643, de pTG6559 (exemplo 6.2) ou no sítio *SspI* de pTG6564 (exemplo 6.2) após ter franqueado os sítios, para produzir pTG1653, pTG1654 e pTG1655, (figura 6) respectivamente.

Gera-se por técnicas convencionais uma célula de complementação susceptível de complementar *en trans* as funções E1 e E4, por:

- (1) transformação de pTG1653 na linha celular 293, ou
- (2) transformação de pTG1654 ou pTG1655 na linha celular A549.

De uma maneira geral, a expressão dos produtos das regiões E1 e E4 é acompanhada por um efeito citotóxico. Um certo número de clones 293-1653 é susceptível de complementar simultaneamente adenovírus eliminados de E1 e adenovírus eliminados de E4.

Uma outra alternativa consiste em proceder da maneira seguinte.

Submete-se o vector M13TG1646 a uma mutagénese dirigida com o oligonucleotido mutagénico OTG5991 (SEQ ID NO: 40) com o objectivo de eliminar o promotor da região E4 e de inserir um sítio *HpaI*. O vector mutado é designado por M13TG6522. É digerido por *PstI*, tratado com ADN de polimerase do fago T4 e depois com *AvrII* e posto em ligação com um fragmento *EcoRI* (Klenow)-*AvrII* purificado de pTG1652 (exemplo 8), para se obter pTG6595. Cinde-se este último com *HpaI* e introduz-se o fragmento de 0,8 kb obtido de pTG5913 (figura 7) após digestão *BglII* e *BamHI* e tratamento com a Klenow. Produz-se o pTG6596 no qual a região E4 (posições 32800 a 35826) se encontra

colocada sob o controlo do promotor TK. A título indicativo, o pTG5913 suporta o gene TK-HSV-1 e o fragmento *BglII-BamHI* corresponde ao promotor desse gene (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 1441-1445).

Paralelamente, linearizam-se os vectores pTG1643 e pTG6559 (exemplo 6) com *BamHI* e insere-se um fragmento sintético resultante da reassociação dos oligonucleotidos OTG6141 e OTG6142 (SEQ ID NO: 41 e 42), para se obter respectivamente pTG8508 e pTG8507. Cindem-se estes últimos com *BamHI* antes de introduzir o fragmento *BamHI* purificado de pTG6596 que comporta a cassete de expressão de E4. Geram-se os vectores pTG8512 (figura 8) e pTG8513 (figura 9).

Por outro lado, a introdução do fragmento *BamHI* de pTG1652 no vector pTG8508 ou pTG8507 linearizado pela mesma enzima conduz a pTG8514 e pTG8515 respectivamente (figuras 10 e 11).

As linhas celulares transfectadas com pTG8512 ou pTG8515 permitirão complementar um adenovírus defectivo para a função E4, enquanto que aquelas que resultam da transfecção de pTG8513 ou pTG8514 se destinam a ampliar e a propagar adenovírus defectivos para as funções E1 e E4. De igual modo, a transfecção de pTG8512 ou pTG8515 nas células 293 permitirá complementar adenovírus defectivos para E1 e E4.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

(I) INFORMAÇÃO GERAL :

(i) DEPOSITANTE :

(A) NOME : TRANSGENE

(B) RUA : 11, rue de Molsheim

(C) CIDADE : STRASBOURG

(E) PAÍS : FRANÇA

(F) CÓDIGO POSTAL : 67082

(G) TELEFONE : (33) 88.27.91.00

(H) TELECÓPIA : (33) 88.22.58.07

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO : Novos adenovirus defectivos e linhas de complementação correspondentes

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS : 2

(iv) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR :

(A) TIPO DE SUPORTE : Fita

(B) COMPUTADOR : IBM PC compatível

(C) SISTEMA D' EXPLORAÇÃO : PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA : PatentIn Release #1.0, Versão #1.25 (OEB)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 1 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 30 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG4174)

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

GTGACGTCTT TGGTGTTTTC GCGGGAAAAC

30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 2 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 30 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG4173)

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

ACCGAGTAAG ATTTGTCTAG GGCCGCGGGG

30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 3 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 33 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG4191)

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

GGCCATGGTC GCGGGAAAGG GACTTTGACC GTT

33

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 4 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 31 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5021)

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

GAACGGATCC CCAGACTCTG TTTGGATTTG G

31

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 5 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 30 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

258

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5157)

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

CCAGAAATAT CTTCGCCCAG GCCGCCGCC

30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 6 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 20 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5564)

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

GATCCGATAT CCCGTTAACC

20

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 7 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 20 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5565)

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

GATCGGTAA CGGATATCG

20

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 8 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 47 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5892)

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

GTCGTAGGATCCAGCTGCTC CCTGCTTGTG TGTGAGGT CGCTGAG 47

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 9 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 47 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5893)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 9 :

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGTGGTGAATGGTCAAATGG 47

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 10 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 46 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5920)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 10 :

ACGGTAGGATCCGACGTCGGTGAGCTCCTC GCTTGGTCTC CGTCCG 46

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 11 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 24 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5891)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 11 :

CAACCCCGAT TCTAGAGAAA CCTG

24

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 12 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 35 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6079)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 12 :

GCGCAGTTGC TCTGCGGATC CACTTAACAT TCAGT

35

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 13 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 38 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6080)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 13 :

TAAAAGTACC AGGTAAGGAT CCCCTTGGTT TGCTTGGG

38

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 14 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 21 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6064)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 14 :

GAAACCGAAT TCTCTTGGA C

21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 15 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 32 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6065)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 15 :

ACGAATGCAG CTCTCCACTT AACATTCAGT CG

32

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 16 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 27 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5481)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 16 :

CAGTGAATTC ATCATCAATA ATATACC

27

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 17 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 24 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5482)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 17 :

AAACTGGTCA CCGTGATTAA AAAG

24

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 18 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 25 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5455)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 18 :

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC

25

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 19 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 28 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5456)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 19 :

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC

28

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 20 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 18 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5728)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 20 :

TGTAGCAGGA GGACTAAG

18

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 21 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 39 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5729)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 21 :

CCGCATTAAT TAACCGCGAC AAACGATTCT TTATTCTTG 39

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 22 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 36 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (5730)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 22 :

CGCGGTTAAT TAATGCGGTA AAACCTACGT CACCCG 36

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 23 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 30 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6060)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 23 :

AATAAAAGAT CATTATTTTC ATTAGA ACTG

30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 24 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 24 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6061)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 24 :

TGTGTTGGTT TTTTGTGTGT TAAT

24

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 25 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 30 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6062)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 25 :

TAACACACAA AAAACCAACA CACAGTTCTA

30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 26 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 24 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6063)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 26 :

ATGAAAATAA TGATCTTTTA TTAT

24

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 27 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 32 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG4564)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 27 :

TCCGTGAATT CTAGTAGTGT GGCGGAAGTG TG

32

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 28 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 23 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG4565)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 28 :

TCCAGTCCGG AGAACCGGGC GCC

23

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 29 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 28 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5013)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 29 :

TAACCTGCAG GAGTGCCAGC GAGTAGAG

28

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 30 :

250

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 21 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5015)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 30 :

CAACGCGCAT GCCCCCATGG G

21

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 31 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 31 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5014)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 31 :

TAGGAGATCT GTTTTAAACC GCATTGGGAG G

31

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 32 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 34 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 32 :

CGGAGTACTG TCCTCCGCGG AGTACTGTCC TCCG

34

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 33 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 34 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 33 :

CGGAGGACAG TACTCCGCGG AGGACAGTAC TCCG

34

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 34 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 16 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5039)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 34 :

TGCTGGATAT CAGTCA

16

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 35 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 24 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5040)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 35 :

GATCTGACTG ATATCCAGCA TGCA

24

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 36 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 20 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5024)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 36 :

CTCCTGCCTA GGCAAAATAG

20

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 37 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 32 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5025)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 37 :

GCAGATGGAT CCGGGCGGAG TAACTTGTAT GT

32

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 38 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 31 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5078)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 38 :

GTCGCGGATC CGTTATGTTT CAACGTGTTT A

31

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 39 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 20 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5079)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 39 :

ACATGAACTT AAGCGAGCTG

20

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 40 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 38 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG5991)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 40 :

CACGGCACCA GCTCAAGTTA ACGGATCCAT CTGCGGGT 38

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 41 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 27 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : NÃO

(vi) ORIGEM :

(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6141)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 41 :

GATCCTGTGT GTTGGTTTTT TGTGTGC 27

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº : 42 :

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA :

(A) COMPRIMENTO : 27 pares de bases

(B) TIPO : ácido nucleico

(C) NÚMERO DE CORDÕES : simples

(D) CONFIGURAÇÃO : linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA : ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO : NÃO

(iii) ANTI-SENTIDO : SIM

(vi) ORIGEM :

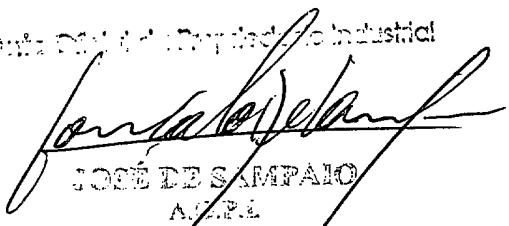
(A) ORGANISMO : Oligonucleotido de síntese (OTG6142)

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA : SEQ ID Nº : 42 :

GATCGCACAC AAAAAACCAA CACACAG

27

Lisboa, 6 de Outubro de 2000

121
O Agente da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A/221
Rua do Sulfato, 193, r/-Drt.
1250 LISBOA

259

REIVINDICAÇÕES

1. Linha celular de complementação que comporta um elemento de complementação, que compreende em especial uma parte da região E1 do genoma de um adenovírus com exclusão da ITR 5; sendo o referido elemento de complementação susceptível de complementar *en trans* um vector adenoviral defectivo e sendo integrado no genoma da referida linha celular de complementação ou inserido num vector de expressão.

2. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 1, que compreende em particular:

- (i) toda ou parte da região E1A do genoma de um adenovírus; e
- (ii) toda ou parte de pelo menos uma região do referido genoma seleccionado entre as regiões E1B, E2 e E4.

3. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 1, que compreende em particular:

- (i) toda ou parte da região E1A do genoma de um adenovírus; e
- (ii) toda ou parte de pelo menos duas das regiões E1B, E2 e E4 do referido genoma.

4. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 1, que compreende em especial:

- (i) toda ou parte da região E1A do genoma de um adenovírus; e
- (ii) toda ou parte das regiões E1B, E2 e E4 do referido genoma.

5. Linha celular de complementação de acordo com uma das

reivindicações 2 a 4, que compreende em especial toda ou parte da região E1A e a totalidade da região E1B do genoma de um adenovírus que codifica para as proteínas precoces.

6. Linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, que compreende em especial uma parte de um genoma de um adenovírus escolhido entre os adenovírus caninos, aviários e humanos.

7. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 6, que compreende em especial uma parte do genoma de um adenovírus humano de tipo 5.

8. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 7, que compreende em especial a parte do genoma de um adenovírus humano de tipo 5

- (i) que se estende do nucleotido 100 ao nucleotido 5297;
- (ii) que se estende do nucleotido 100 ao nucleotido 4034; ou
- (iii) que se estende do nucleotido 505 ao nucleotido 4034.

9. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 7 ou 8, que compreende em especial a parte da região E4 do genoma de um adenovírus humano de tipo 5 que se estende do nucleotido 32800 ao nucleotido 35826.

10. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 7, que compreende em especial a parte do genoma de um adenovírus humano de tipo 5 que se estende do nucleotido 505 até ao nucleotido 35826.

11. Linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, que compreende uma parte da região E1A do genoma de um adenovírus desprovido do seu promotor natural, encontrando-se a referida parte

colocada sob o controlo de um promotor apropriado.

12. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 11, na qual a referida parte da região E1A se encontra colocada sob o controlo de um promotor induzível por uma proteína trans-activadora de transcrição não-adenoviral.

13. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 12, na qual a referida proteína trans-activadora de transcrição não-adenoviral é codificada por um vector adenoviral recombinante, encontrando-se este vector adenoviral colocado sob o controlo de elementos necessários à sua expressão numa célula hospedeira e comportando um gene que pode codificar em especial para uma proteína trans-activadora de transcrição Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.

14. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 12 ou 13, na qual a referida parte da região E1A, se encontra colocada sob o controlo de um promotor induzível por uma proteína trans-activadora da transcrição Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.

15. Linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 14, que compreende ainda um gene que codifica para uma marcador de selecção.

16. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 15, na qual o gene de selecção codifica para a puromicina acetil-transferase.

17. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 15 ou 16, na qual o gene de selecção se encontra colocado sob o controlo de um promotor induzível, por uma proteína trans-activadora da transcrição codificada pela região E1A do genoma de um adenovirus selvagem, em especial sob o controlo do

promotor da região E2 do referido genoma.

18. Linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 17, derivada de uma linha celular aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

19. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 18, derivada de uma linha celular escolhida entre as linhas Vero, BHK, A549, MRC5, WI38 e CHO.

20. Linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 17, derivada de uma célula da retina de um embrião humano.

21. Linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 20, que comporta um elemento de complementação susceptível de complementar *en trans* a função E1 de um vector adenoviral defectivo, sendo o referido elemento de complementação em especial desprovido da ITR5', da região de encapsidação, do promotor da região E1A e do sinal de terminação da transcrição das unidades transcricionais E1B e pIX.

22. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo facto de o referido elemento de complementação da função E1 se encontrar colocado sob o controlo de um promotor heterólogo, em especial o promotor do gene murino PGK.

23. Linha celular de complementação de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizada pelo facto de se colocar o referido elemento de complementação da função E1 sob o controlo de um sinal de terminação da transcrição heteróloga, em especial o do gene β -globulina de coelho.

24. Composição farmacêutica que compreende a título de agente terapêutico ou profilático uma linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 23, em associação com um suporte aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

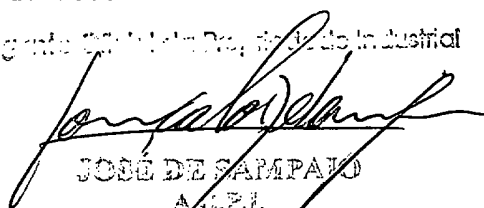
25. Utilização de uma linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 23 para a preparação de uma composição farmacêutica para transferir moléculas de ADN numa célula ou num organismo eucariota.

26. Processo para a preparação de uma partícula de adenovírus que compreende um vector adenoviral defectivo para a replicação que deriva do genoma de um adenovírus por eliminação de pelo menos toda ou parte da região E1A de acordo com o qual:

- (i) se introduz o referido vector adenoviral numa linha celular de complementação de acordo com uma das reivindicações 1 a 23 susceptível de complementar *en trans* o referido vector adenoviral para se obter uma linha celular de complementação transfectada;
- (ii) se cultiva a referida linha celular de complementação transfectada em condições apropriadas para permitir a produção da referida partícula de adenovírus; e
- (iii) se recupera a referida partícula de adenovírus na cultura celular.

Lisboa, 6 de Outubro de 2000

12/ O Agente Especializado no Registo Industrial



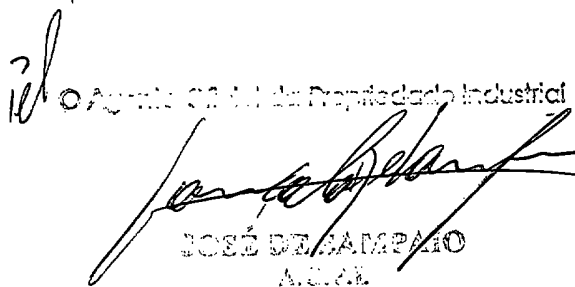
JOSÉ DE SAMPAIO
A.C.P.I.
Rua do Salitre, 195, 1/c-Drt.
1250 LISBOA

RESUMO

“NOVAS LINHAS CELULARES DE COMPLEMENTAÇÃO PARA VECTORES ADENOVIRAIS DEFECTIVOS”

A presente invenção tem por objecto uma linha celular de complementação que comporta um elemento de complementação que compreende em especial uma parte da região E1 do genoma de um adenovírus com exclusão da ITR 5'; o referido elemento de complementação é susceptível de complementar *en trans* um vector adenoviral defectivo e é integrado no genoma da referida linha de complementação ou inserido num vector de expressão.

Lisboa, 6 de Outubro de 2000


O Agente da Propriedade Industrial
JOSE DE SAMPAIO
A.D.P.I.
Rua do Estivo, 185, r/c-Drt.
1250 LISBOA

288

1/11

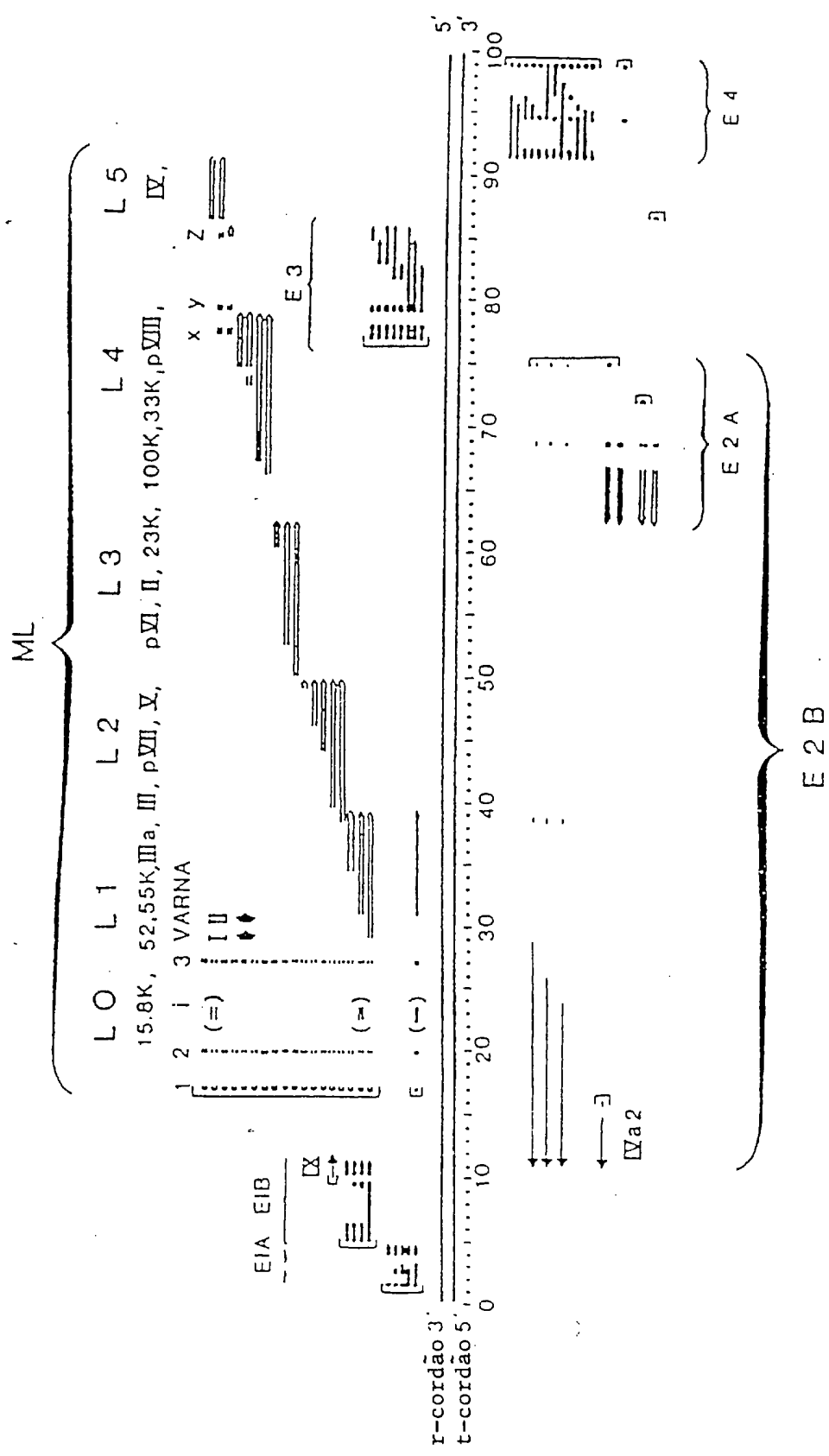


FIGURA 1

258

2/11

pTG6546

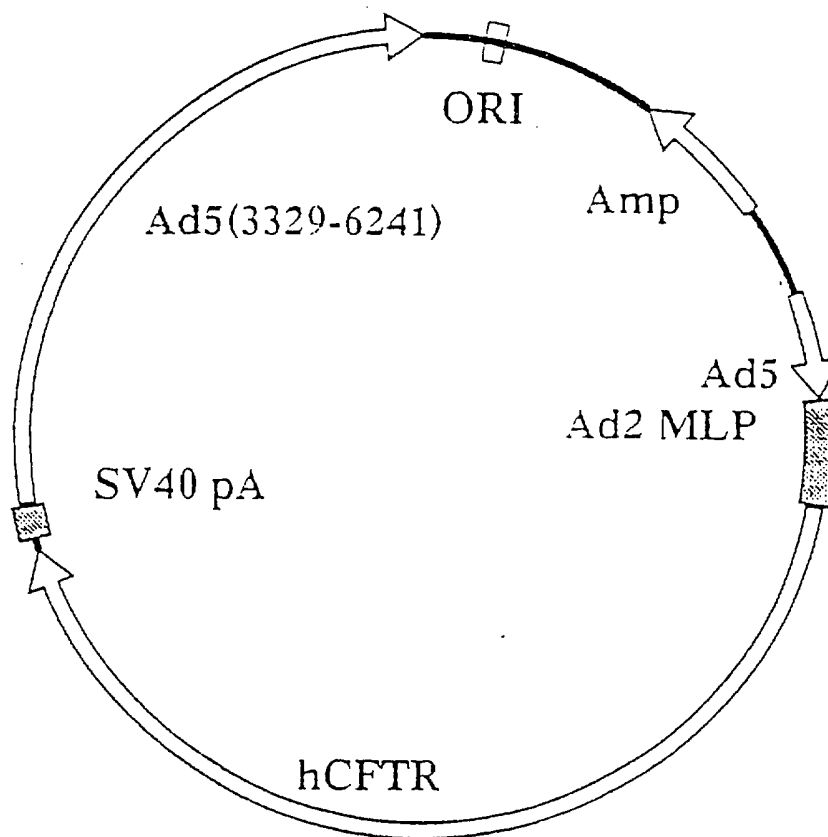


FIGURA 2

3 / 11

pTG6581

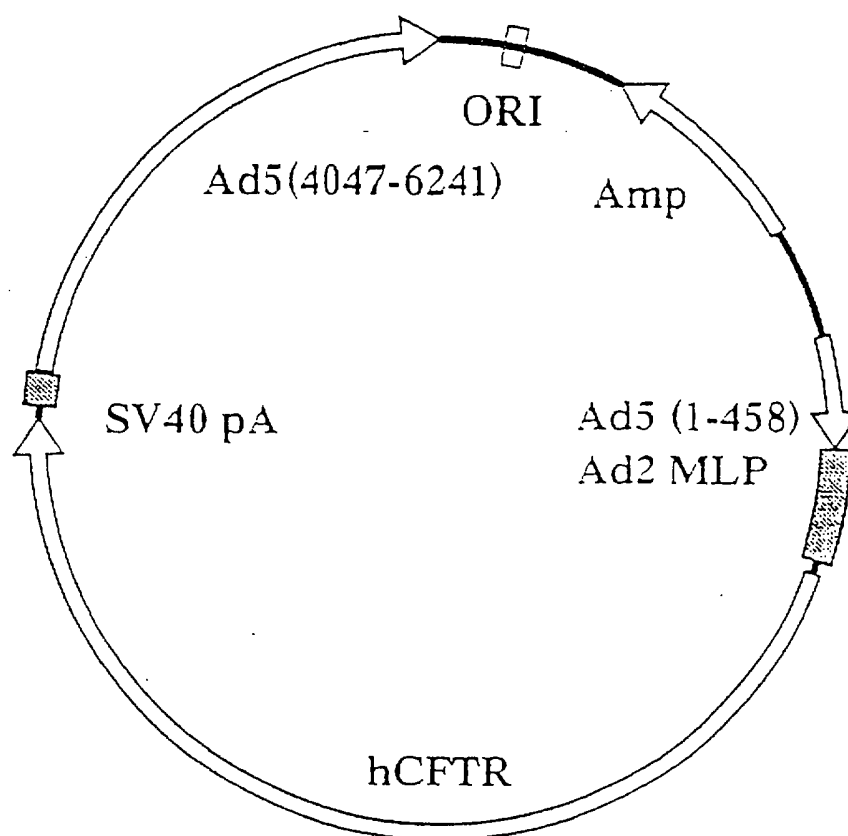


FIGURA 3

258

4 / 11

pTG6303

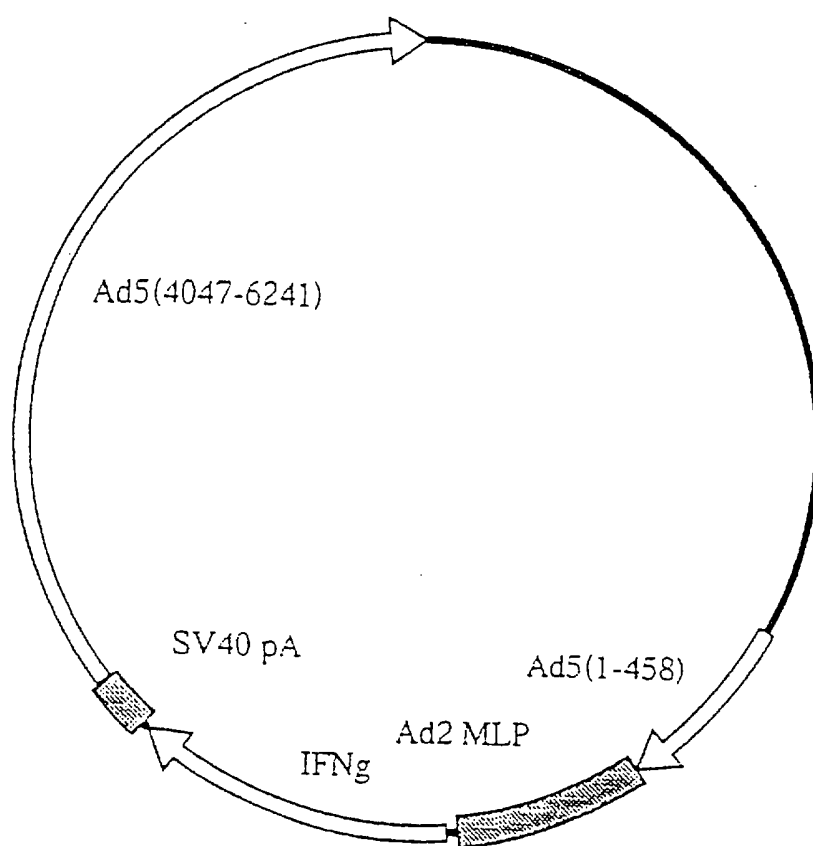


FIGURA 4

258

5/11

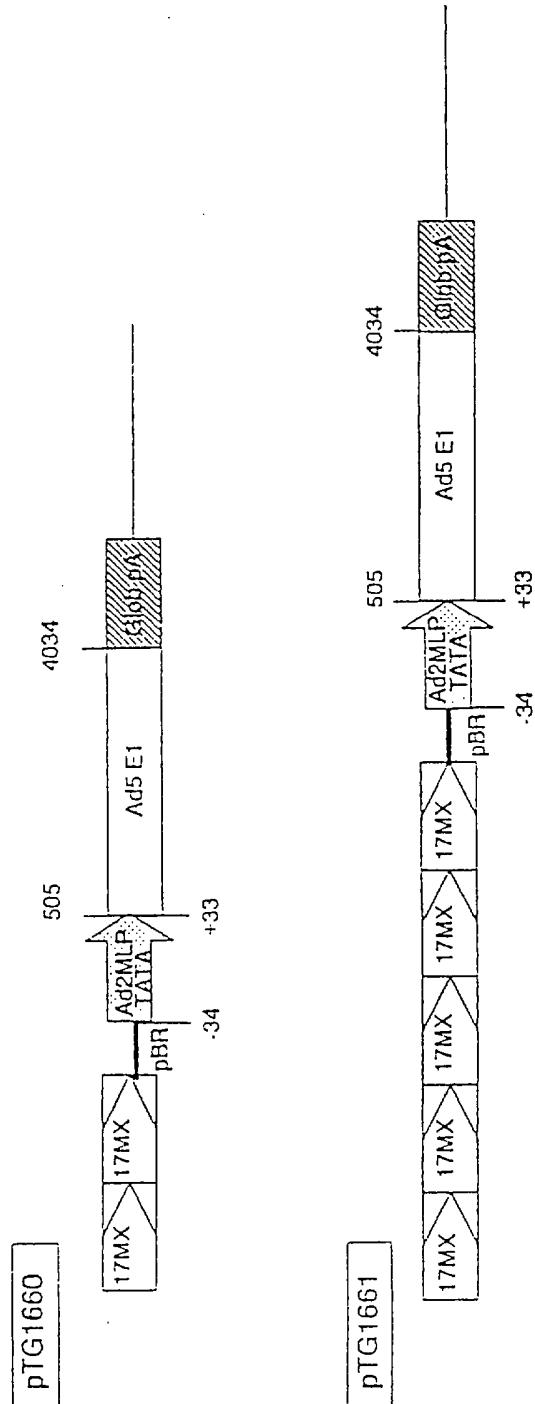


FIGURA 5

288

6/11

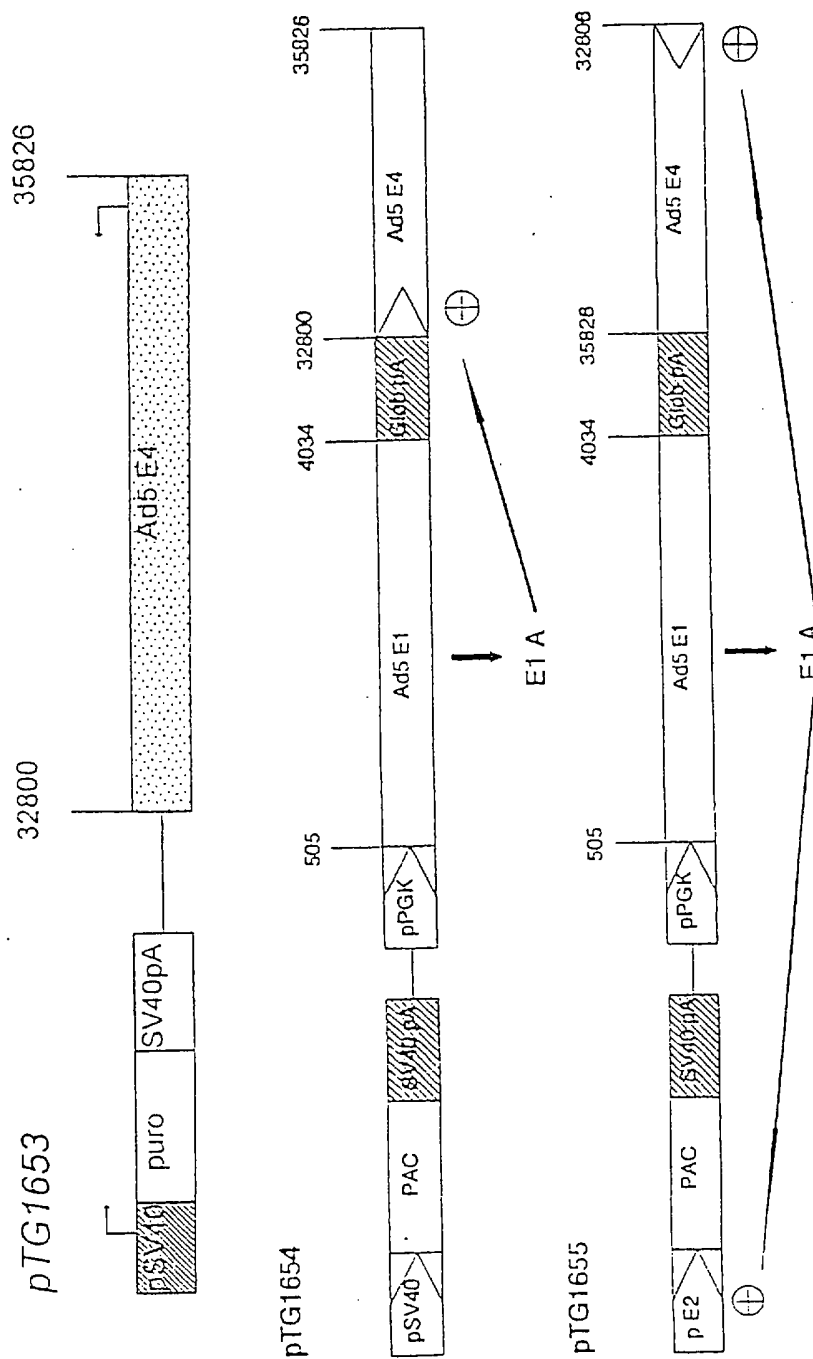


FIGURA 6

258

7/11

pTG5913

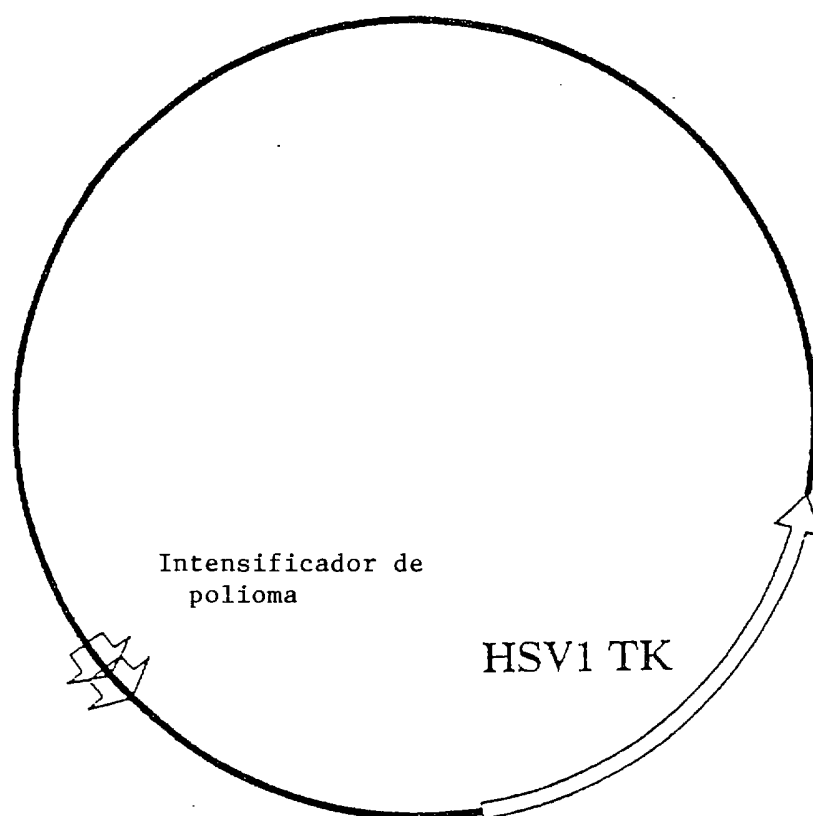


FIGURA 7

758

8/11

pTG8512

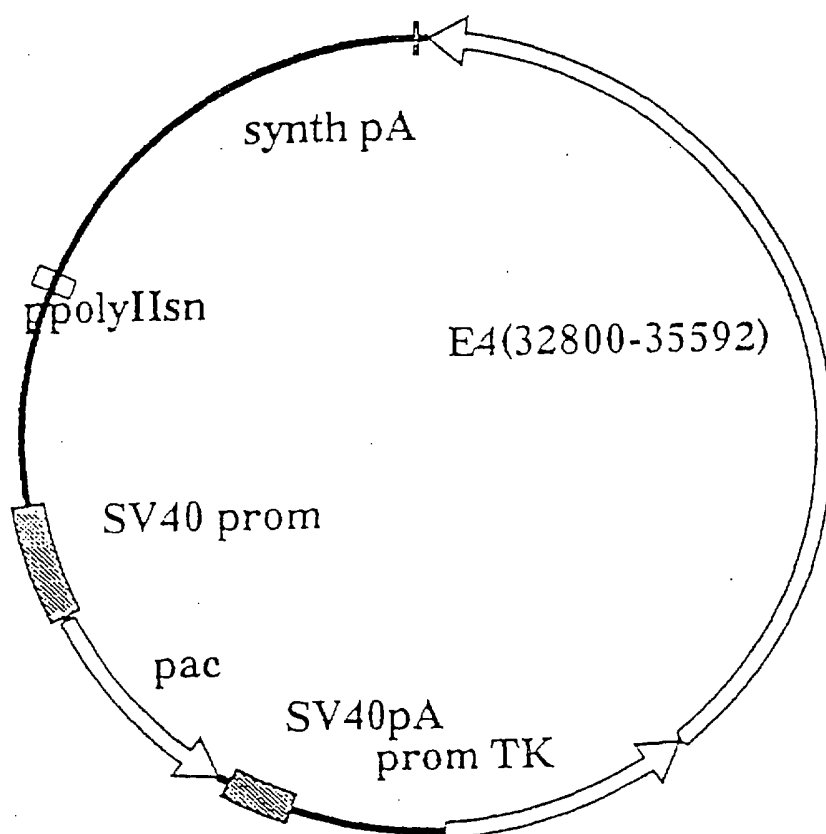


FIGURA 8

258

9/11

pTG8513

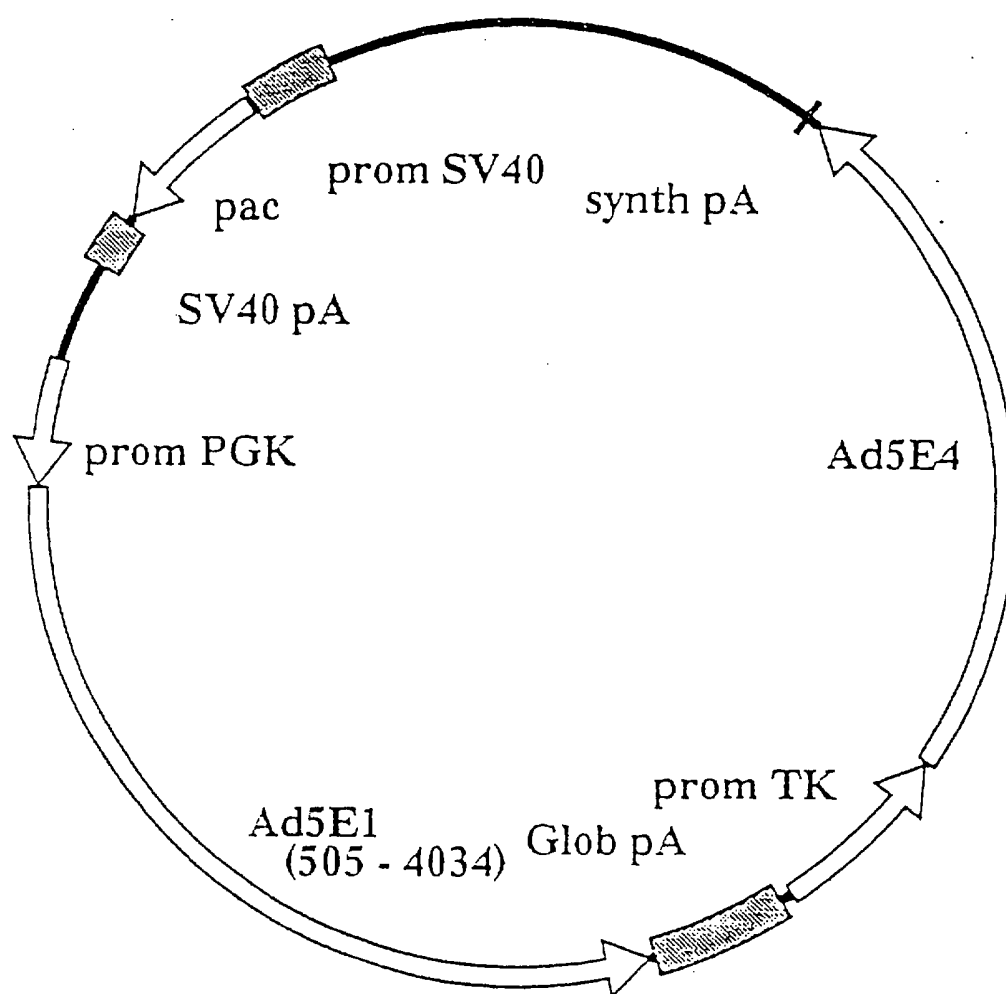


FIGURA 9

258

10/11

pTG8514

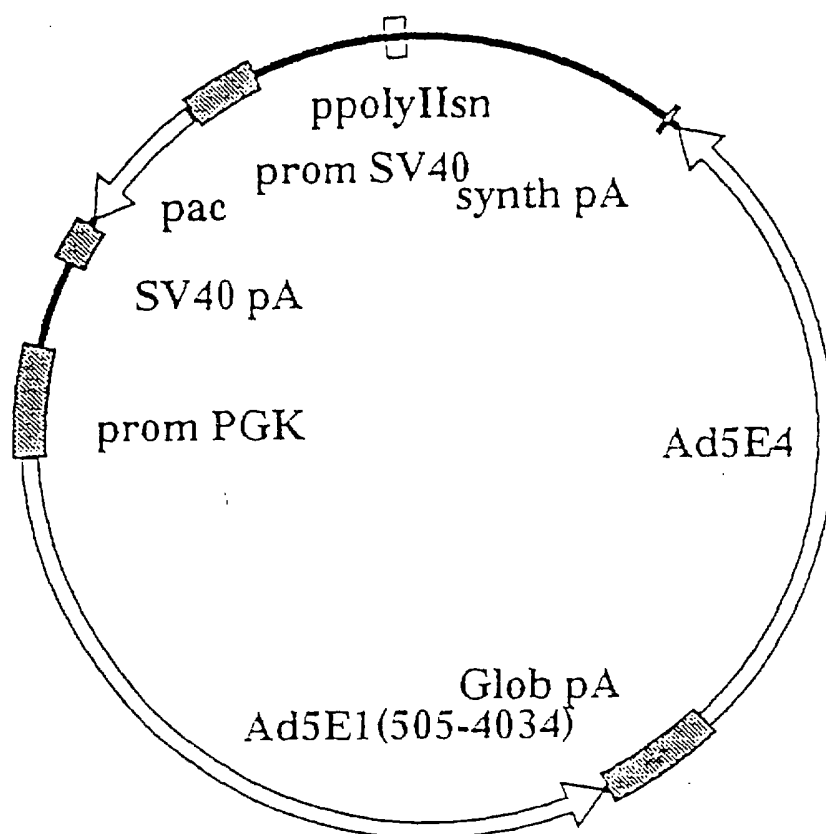


FIGURA 10

258

11/11

pTG8515

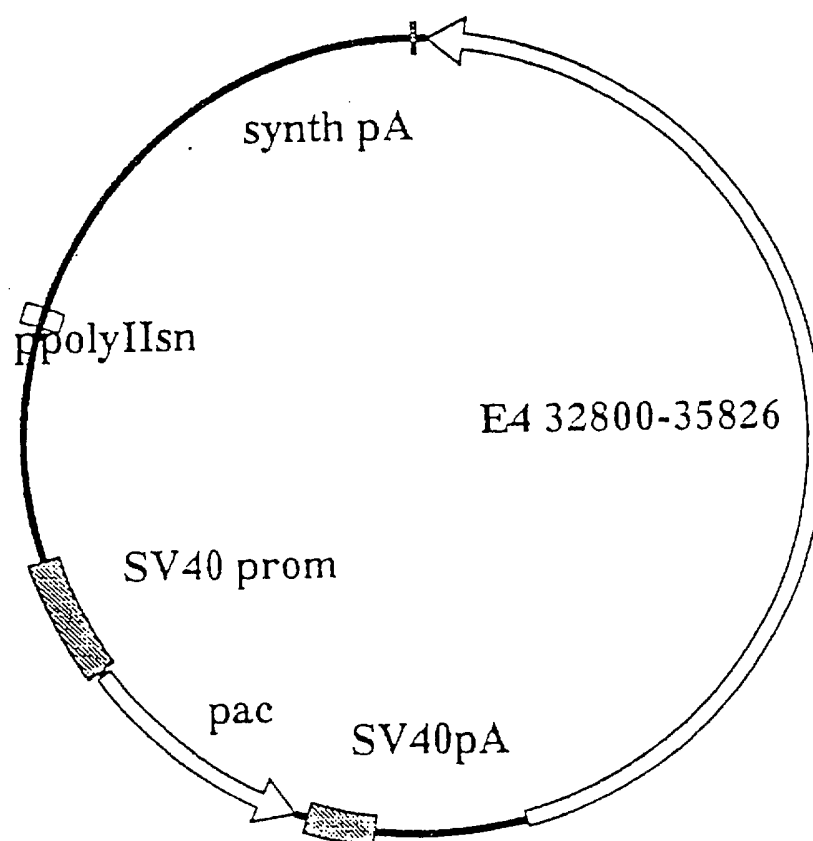


FIGURA 11