



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* PT 809516 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K048/00 A

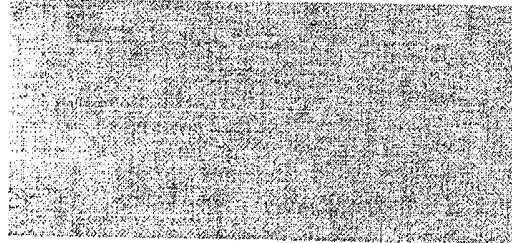
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1996.02.12	(73) <i>Titular(es):</i> AVENTIS PHARMA, S.A. 20 AVENUE RAYMOND ARON, 92160 ANTONY FR
(30) <i>Prioridade:</i> 1995.02.14 FR 9501662	INST. NAT. SANTE ET RECHERCHE MEDICALE (INSERM) 101, RUE TOLBIAC F-75013 PARIS FR
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.12.03	(72) <i>Inventor(es):</i> JEAN-FRANÇOIS BACH MICHEL PERRICAUDET LUCIENNE CHATENOUD HEDI HADDADA MARTIN LEE FR FR FR FR FR
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.08.22	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ASSOCIAÇÃO MEDICAMENTOSA ÚTIL PARA A TRANSFECCÃO E EXPRESSÃO IN VIVO DE EXOGENES

(57) *Resumo:*

ASSOCIAÇÃO MEDICAMENTOSA ÚTIL PARA A TRANSFECCÃO E EXPRESSÃO
IN VIVO DE EXOGENES



DESCRICAÇÃO

"Associação medicamentosa útil para a transfecção e expressão *in vivo* de exógenos"

O presente invento refere-se ao domínio da terapia génica e nomeadamente à utilização de adenovírus para a expressão de genes de interesse terapêutico. Refere-se mais particularmente a um novo modo de tratamento das patologias de origem genética com base na utilização combinada de dois tipos de agentes terapêuticos.

A terapia génica consiste na correcção de uma deficiência ou de uma anomalia (mutação, expressão anormal, etc.) através da introdução de uma informação genética na célula ou órgão afectado. Esta informação genética pode ser introduzida quer *in vitro* quer *ex vivo* numa célula extraída do órgão, sendo a célula modificada então reintroduzida no organismo, directamente *in vivo* no tecido apropriado. Neste segundo caso, existem diferentes técnicas físicas de transfecção, entre as quais o emprego de vírus como vectores. A este respeito, diferentes vírus foram testados quanto à sua capacidade para infectar certas populações celulares. Em particular, os retrovírus (RSV, HMS, MMS, etc.), o vírus HSV, os vírus adeno-associados e os adenovírus.

Entre estes vírus, os adenovírus apresentam certas propriedades interessantes para uma utilização em terapia génica. Estes têm um espectro de hospedeiros bastante largo, são capazes de infectar células quiescentes e não se integram no genoma da célula infectada. Os adenovírus são vírus de ADN de cadeia dupla linear com um tamanho aproximado de 36 kb. O seu genoma compreende nomeadamente uma sequência invertida repetida (ITR) na sua extremidade, uma sequência de encapsidação, genes precoces e genes tardios (Ver figura 1). Os principais genes precoces são os genes E1 (E1a e E1b), E2, E3 e E4. Os principais genes tardios são os genes L1 a L5.

Tendo em conta as propriedades dos adenovírus acima mencionados, estes foram já utilizados para a transferência de genes *in vivo*. Para este efeito, foram preparados diferentes vectores derivados de adenovírus, incorporando diferentes genes (β -gal, OTC, α -1AT, citóquinas, etc.). Em cada uma destas construções, o adenovírus foi modificado de maneira a tornar-se incapaz de



replicação na célula infectada. Assim, as construções descritas na arte anterior são adenovírus com deleções das regiões E1 (E1a e/ou E1b) e eventualmente E3 ao nível das quais é inserida uma sequência de ADN heteróloga (Levrero *et al.*, *Gene* 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury *et al.*, *Gene* 50 (1986) 161).

Contudo, como para todos os vírus conhecidos, a administração de um adenovírus selvagem (Routes *et al.*, *J. Virol.* 65 (1991) 1540) ou recombinante defectivo para a replicação (Yang *et al.*, *PNAS* (1994) 4407), induz uma resposta imunitária importante.

A principal finalidade do sistema imunitário é a integridade do indivíduo ou a integridade do "próprio". Este conduz à eliminação de agentes infecciosos assim como à rejeição de enxertos e de tumores sem que no entanto estes poderosos mecanismos de defesa do organismo se voltem contra si e dêem lugar às doenças autoimunes. Este estado de não resposta face a antigénios "próprios" enquanto que os antigénios estranhos são eliminados é definido como um estado de tolerância fisiológica. Para eliminar os agentes estranhos, o sistema imunitário desenvolve dois tipos de mecanismos. O primeiro é a produção de anticorpos específicos pelos linfócitos B; falamos de imunidade humoral. Estes anticorpos vão fixar o antigénio e inactivá-lo ou eliminá-lo do organismo. O segundo mecanismo de defesa refere-se à imunidade celular e utiliza os linfócitos T, e de entre estes, os linfócitos T citotóxicos, portadores de um receptor específico do antigénio considerado. O reconhecimento do antigénio pelo receptor T necessita que este seja expresso em associação com proteínas codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade ou MHC de classe I e de classe II.

Como consequência, esta resposta imunitária desenvolvida contra as células infectadas constitui um obstáculo principal à utilização de vectores virais em terapia génica visto que (i) induzindo uma destruição das células infectadas esta limita a duração da expressão do gene terapêutico e portanto o efeito terapêutico, (ii) esta induz paralelamente uma resposta inflamatória importante, e (iii) esta leva à eliminação rápida das células infectadas após injeções repetidas. Entenda-se que a amplitude desta resposta imunitária para com as células infectadas varia consoante a natureza do órgão submetido à injeção e o modo de injeção utilizado. É deste modo que a expressão da β -galactosidase, codificada por um adenovírus recombinante administrado no músculo de

ratinhos imunocompetentes, é reduzida para níveis mínimos 40 dias após a injeção (Kass-Eisler *et al.*, *PNAS* 90 (1993) 11498). Do mesmo modo, a expressão de genes transfectados por adenovírus para o fígado é significativamente reduzida nos 10 dias que se seguem à injeção (Yang Y *et al.* 1994 *Immunity* 1 433-442) e a expressão do factor IX transferido por adenovírus para os hepatócitos de cães hemofílicos desaparece 100 dias após a injeção (Kay *et al.*, *PNAS* 91 (1994) 2353).

Na perspectiva de uma exploração em terapia génica de vectores derivados de adenovírus, torna-se portanto necessário controlar a resposta imunitária desenvolvida contra estes ou contra as células que eles infectam.

Do precedente, sobressai que a activação do sistema imunitário necessita previamente de um reconhecimento por este de elementos estranhos ao organismo (o não próprio ou próprio modificado) como os vectores derivados de adenovírus, que devem em tempo normal ser destruídos. Ao longo dos últimos anos foram desenvolvidas estratégias de imuno-intervenção onde o objectivo é criar um ambiente imunitário "permissivo", ou seja indução de um estado de tolerância, face a antigénios estranhos predefinidos.

É precisamente a este nível que intervém o presente invento. Este visa prevenir a eliminação rápida de adenovírus das células infectadas e portanto prolongar de forma consequente a expressão *in vivo* do gene terapêutico de que são portadores.

Recentemente, os requerentes demonstraram que a co-expressão nas células infectadas de certos genes é capaz de induzir um efeito imunoprotector e assim fazer escapar os vectores e/ou as células infectadas ao sistema imunitário. Eles aperfeiçoaram nomeadamente adenovírus nos quais a expressão de um gene de interesse terapêutico está associada à de um gene imunoprotector (FR N°9412346). Pode nomeadamente tratar-se de um gene cujo produto age sobre a actividade do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou sobre a actividade de citóquinas permitindo reduzi-las consideravelmente, procurando suprimir toda a reacção imunitária contra o vector ou as células infectadas. Estes inibem pelo menos parcialmente a expressão das proteínas do MHC ou a apresentação antigénica tendo como

consequência vantajosa uma redução notável da reacção imunitária contra o vector ou as células infectadas e portanto um efeito terapêutico prolongado.

De forma inesperada, os requerentes demonstraram que era possível prolongar significativamente o efeito terapêutico de um tal vector associando-lhe um imunossupressor. A eliminação do vector considerado e/ou a destruição das células infectadas, pelo sistema imunitário, encontram-se retardadas por um período claramente superior ao que podemos esperar pela simples justaposição dos efeitos imunoprotectores do referido vector e do imunossupressor. Vantajosamente, a associação medicamentosa objecto do presente invento induz um fenómeno de "pseudo-inércia" do sistema imunitário propício à expressão a longo prazo de um gene terapêutico.

No sentido do presente invento, imunossupressor designa qualquer composto capaz de inibir em parte ou totalmente pelo menos uma via de sinalização imunitária. De uma forma geral, os imunossupressores são habitualmente utilizados em transplantação, com o fim de prevenir a rejeição de aloenxertos, e no tratamento de certas doenças autoimunes. Os produtos classicamente utilizados são quer imunossupressores químicos como os corticosteróides, a azatioprina, a ciclosporina, o FK506, quer imunossupressores biológicos tais como anticorpos policlonais ou monoclonais. A primeira categoria de imunossupressores, e entre estes sobretudo a ciclosporina e o FK506, inibem de forma importante a produção de citóquinas tais como a interleucina 2, cujo papel na diferenciação e na proliferação das células linfocitárias é essencial. Infelizmente, a eficácia deste tipo de imunossupressores necessita da sua administração permanente que é confrontada mais cedo ou mais tarde com o problema da sua toxicidade. Assim a azatioprina é potencialmente mielotóxica e a ciclosporina é nefrotóxica e pode além disso acarretar uma hipertensão ou problemas neurológicos.

No que diz respeito mais particularmente a anticorpos, trata-se de anticorpos dirigidos contra as células linfóides do sistema imunitário. O primeiro anticorpo utilizado a título de imunossupressor é o anti-CD3, dirigido contra os linfócitos T. O seu alvo é uma das cadeias polipeptídicas da molécula CD3 que compõe o receptor para o antígeno das células T. Segue-se uma inactivação funcional das células T CD3+ reconhecidas pelos anticorpos. No caso da problemática que aqui nos interessa, a administração de um imunossupressor

deste tipo juntamente com a de um adenovírus recombinante contendo um gene terapêutico seria um meio de bloquear a reacção imunitária do hospedeiro face ao vector viral e/ou aos seus produtos expressos à superfície das células infectadas. Com o mesmo princípio podemos utilizar anticorpos anti-CD4, -CD2, -CD8, -CD28, -B7, -ICAM-1 e -LFA-1.

Os requerentes aperfeiçoaram agora um novo modo de tratamento particularmente eficaz para retardar de forma importante e mesmo inibir a reacção do sistema imunitário sem levantar problemas de toxicidade.

Mais precisamente, o presente invento resulta da evidência de um efeito sinérgico particularmente importante ligado à utilização combinada de um adenovírus recombinante no qual a expressão de um gene de interesse terapêutico está associada à de um gene imunoprotector, tal como descrito anteriormente, e pelo menos um agente imunossupressor.

Um primeiro objectivo do presente invento refere-se então a uma associação medicamentosa de pelo menos um agente imunossupressor e pelo menos um adenovírus recombinante cujo genoma compreende um primeiro ADN recombinante contendo um gene terapêutico e um segundo ADN recombinante contendo um gene imunoprotector, para uma utilização consecutiva, intermitente e/ou simultânea no tempo, útil para transfecções exogénicas *in vivo* e/ou *ex vivo*.

Tal como indicado mais à frente, o presente invento assenta nomeadamente na evidência de um efeito sinérgico entre a actividade do agente imunossupressor e o efeito do gene imunoprotector expresso, sobre a expressão do gene terapêutico.

Esta utilização combinada permite um efeito terapêutico nitidamente prolongado e necessita vantajosamente de doses significativamente reduzidas nomeadamente de agente imunossupressor.

Tal como indicado mais à frente, os dois componentes e a associação combinada do presente invento podem ser utilizados de forma consecutiva, intermitente e/ou simultânea no tempo. De preferência, o agente imunossupressor é injectado antes e depois da injeção do adenovírus. Segundo



esta concretização do presente invento, a administração do imunossupressor pode ser espaçada no tempo e preferencialmente renovada regularmente. Neste caso particular os dois componentes são condicionados separadamente. No caso de uma administração simultânea, estes podem ser misturados extemporaneamente antes de serem administrados em conjunto ou, pelo contrário, administrados simultaneamente mas de forma separada. Em particular, as vias de administração dos dois agentes podem ser diferentes.

Segundo o presente invento, podemos utilizar, a título de agente imunossupressor, qualquer composto capaz de inibir em parte ou na totalidade pelo menos uma via de sinalização imunitária. Pode nomeadamente ser escolhido de entre a ciclosporina, o FK506, a azatioprina, os corticosteróides e quaisquer anticorpos mono- ou policlonais. Trata-se de preferência de anticorpos capazes de inactivar as moléculas imunitárias ou de provocar a destruição das células imunitárias portadoras dessas moléculas. Podemos nomeadamente utilizar a título de anticorpos, os anti-CD4, -CD3, -CD2, -CD8, -CD28, -B7, -ICAM-1, -LFA-1. Podem igualmente tratar-se de moléculas híbridas como a CTLA4lg, uma proteína de fusão entre a molécula CTLA-4 (um homólogo do CD28) e uma imunoglobulina. O local G1Fc desta molécula ligando-se à molécula B7 revela-se capaz de inibir a activação das células T (D. J. Lenschow; *Science*, 257, 789, 1992). É claro que o alcance do presente invento não está de modo algum limitado aos imunossuppressores acima enumerados. Estes imunossuppressores podem ser empregues de forma isolada ou em associação.

No que se refere aos ADN recombinantes presentes no genoma do adenovírus postos em prática segundo o presente invento, trata-se de fragmentos de ADN contendo o gene considerado (terapêutico ou imunoprotector) e eventualmente de sinais que permitem a sua expressão, construídos *in vitro* e depois inseridos no genoma do adenovírus. Os ADN recombinantes utilizados no âmbito do presente invento podem ser ADN complementares (ADNc), ADN genómicos (ADNg), ou construções híbridas consistindo, por exemplo, num ADNc no qual seriam inseridos um ou vários intrões. Pode igualmente tratar-se de sequências sintéticas ou semi-sintéticas. Estes ADN podem ser de origem humana, animal, vegetal, bacteriana, viral, etc. De forma particularmente vantajosa, utilizamos ADNc ou ADNg.



Como gene terapêutico utilizável para a construção de vectores do presente invento, podemos citar qualquer gene que codifique um produto possuindo um efeito terapêutico. O produto assim codificado pode ser uma proteína, um péptido, um ARN, etc.

Tratando-se de um produto proteico, este pode ser homólogo face à célula alvo (ou seja um produto que é normalmente expresso na célula alvo desde que esta não apresente nenhuma patologia). Neste caso, a expressão de uma proteína permite por exemplo remediar uma expressão insuficiente na célula ou a expressão de uma proteína inactiva ou fracamente activa devido a uma modificação, ou ainda sobre-expressar a referida proteína. O gene terapêutico pode também codificar para um mutante de uma proteína celular, possuindo uma estabilidade acrescida, uma actividade modificada, etc. O produto proteico pode igualmente ser heterólogo face à célula alvo. Neste caso, uma proteína expressa pode por exemplo completar ou conferir uma actividade deficiente na célula, permitindo-lhe lutar contra uma patologia ou estimular uma resposta imunitária.

Entre os produtos proteicos terapêuticos no sentido do presente invento, podemos citar mais particularmente as enzimas, os derivados sanguíneos, as hormonas, interleucinas, interferões, TNF, etc. (FR 9203120), os factores de crescimento, os neurotransmissores ou seus percussores ou enzimas de síntese, os factores tróficos: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pleiotrofina, etc.; as apolipoproteínas: ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc. (FR 9305125), a distrofina ou uma minidistrofina (FR 9111947), a proteína CFTR associada à mucoviscidose, os genes supressores de tumores: p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc. (FR 9304745), os genes que codificam para factores implicados na coagulação: Factores VII, VIII, IX, os genes intervenientes na reparação do ADN, etc.

Como acima indicado, o gene terapêutico pode igualmente ser um gene ou uma sequência anti-sentido, cuja expressão na célula alvo permite controlar a expressão de genes ou a transcrição de ARNm celulares. Tais sequências podem, por exemplo, ser transcritas na célula alvo em ARN complementares de ARNm celulares e bloquear assim a sua tradução em proteína, segundo a técnica descrita na patente EP 140308. Os anti-sentido compreendem igualmente as sequências que codificam para as ribozimas, que são capazes de destruir selectivamente os ARN alvo (EP 321201).



Os genes terapêuticos podem ser de origem humana, animal, vegetal, bacteriana, viral, etc. Estes podem ser obtidos por qualquer técnica conhecida do prior na arte e nomeadamente por pesquisa de bancos, por síntese química ou ainda por métodos mistos incluindo a modificação química ou enzimática de sequências obtidas por pesquisa de bancos.

O gene imunoprotector utilizado no âmbito do presente invento pode ser de diferentes tipos. Como anteriormente explicitado, trata-se de um gene cujo produto actua sobre a actividade do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou sobre a actividade das citóquinas. Trata-se de preferência de um gene cujo produto inibe pelo menos parcialmente a expressão das proteínas do MHC ou a apresentação antigénica. A título de exemplos preferidos, pode-se citar certos genes contidos na região E3 do adenovírus, o gene ICP47 do vírus do herpes ou o gene UL18 do citomegalovírus.

A região E3 do genoma do adenovírus contém diferentes enquadramentos de leitura que, por processamento alternativo, dão origem a proteínas diferentes. Entre estas, a proteína Gp19k (ou E3-19k) é uma proteína transmembranar glicosilada localizada na membrana do retículo endoplasmático (RE). Esta proteína compreende um domínio luminal ligando as moléculas do MHC-I e uma extremidade citoplasmática C-terminal capaz de ligar os microtúbulos (ou a tubulina), que actua para ancorar a proteína gp19k na membrana do RE. Gp19K é assim capaz de impedir a expressão das moléculas do MHC-I à superfície das células por interacção e sequestro ao nível do RE. Contudo, na ausência de replicação viral, a proteína gp19k é fracamente expressa pelos adenovírus. Por outro lado, a expressão da gp19k está igualmente condicionada à realização de um processamento. A introdução nos vectores do presente invento de um ADN recombinante contendo uma sequência (de preferência ADNc) que codifique para a gp19k permite controlar e otimizar a expressão da referida proteína. Em particular, o emprego de promotores constitutivos e a supressão de outros enquadramentos de leitura permitem aumentar fortemente a expressão desta proteína e eliminar a dependência face à replicação viral e à presença de elementos indutores. Isto permite de forma particularmente vantajosa diminuir consideravelmente a lise pelas CTL das células infectadas e deste modo aumentar e prolongar a produção *in vivo* do gene terapêutico.



Outras proteínas codificadas pela região E3 do genoma do adenovírus tais como as proteínas 10,4k e 14,5k apresentam certas propriedades interessantes com vista à sua incorporação nos vectores do presente invento.

O gene ICP47 do vírus do herpes *simplex* constitui um outro gene imunoprotector particularmente interessante no sentido do presente invento. As células infectadas pelo vírus do herpes *simplex* apresentam uma resistência à lise induzida pelas CTL. Foi demonstrado que esta resistência poderia ser conferida pelo gene ICP47, o qual é capaz de reduzir a expressão das moléculas do MHC-I à superfície das células. A incorporação do gene ICP47 num ADN recombinante segundo o presente invento permite igualmente aos vírus recombinantes do presente invento escapar ao sistema imunitário.

O gene UL18 do citomegalovírus constitui um outro exemplo preferido de gene imunoprotector segundo o presente invento. O produto do gene UL18 é capaz de ligar a β 2-microglobulina (Browne *et al. Nature* 347 (1990) 770). A β 2-microglobulina é uma das cadeias das moléculas MHC-I. A incorporação do gene UL18 num ADN recombinante segundo o presente invento permite deste modo diminuir o número de moléculas de β 2-microglobulina funcionais nas células infectadas pelos vírus do presente invento, e assim diminuir as capacidades dessas células para produzirem moléculas do MHC-I completas e funcionais. Este tipo de construção permite assim proteger as células infectadas da lise pelas CTL.

Como aqui indicado adiante, o gene imunoprotector utilizado no âmbito do presente invento é, numa outra concretização preferida, um gene cujo produto inibe a actividade ou as vias de sinalização das citóquinas. As citóquinas constituem uma família de proteínas segregadas que actuam como moléculas de sinalização para o sistema imunitário. Estas podem atrair as células da imunidade, activá-las, induzir a sua proliferação e mesmo actuar directamente sobre as células infectadas para as matar.

Entre os genes cujo produto afecta a actividade ou as vias de sinalização das citóquinas, podemos citar os genes que intervêm na síntese das citóquinas, ou cujo o produto é capaz de sequestrar as citóquinas, de antagonizar a sua actividade ou de interferir nas vias de sinalização intercelulares. A título de exemplos preferenciais, podemos citar em particular o gene BCRF1 do vírus de

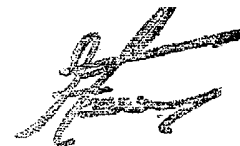
Epstein Barr, os genes *crmA* e *crmB* do vírus da varíola, os genes B15R e B18R do vírus da vacina, o gene US28 do citomegalovírus, os genes E3-14,7, E3-10,4 e E3-14,5 do adenovírus.

O gene B15R do vírus da vacina codifica para uma proteína solúvel capaz de se ligar à interleucina-1 β (a forma segregada da interleucina-1) e assim impedir que esta citóquina se ligue aos seus receptores celulares. A interleucina-1 é com efeito uma das primeiras citóquinas produzidas em resposta a uma agressão antigénica e desempenha um papel muito importante na sinalização do sistema imunitário no início da infecção. A possibilidade de incorporar o gene B15R num vector segundo o presente invento permite reduzir vantajosamente a actividade da IL-1 β , nomeadamente na activação das células imunitárias, e desta forma proteger localmente as células infectadas pelo vírus do presente invento contra uma resposta imunitária importante. Genes homólogos ao gene B15R podem igualmente ser utilizados, tais como o gene do vírus da varíola.

Da mesma forma, o gene B18R do vírus da vacina codifica para uma proteína homóloga ao receptor da interleucina-6. Este gene, ou todo o homólogo funcional, é igualmente utilizável nos vectores do presente invento para inibir a ligação da interleucina-6 ao seu receptor celular e deste modo reduzir localmente a resposta imunitária.

Sempre da mesma forma, o gene *crmB* do vírus da varíola pode ser vantajosamente utilizado. Este gene codifica de facto para uma proteína segregada capaz de se ligar ao TNF e de entrar em competição com os receptores do TNF à superfície das células. Este gene permite portanto, nos vírus do presente invento, diminuir localmente a concentração de TNF activo susceptível de destruir as células infectadas. Outros genes que codifiquem para proteínas capazes de se ligarem ao TNF e de inibir pelo menos parcialmente a sua ligação aos seus receptores podem igualmente ser utilizados.

O gene *crmA* do vírus da varíola codifica para uma proteína com uma actividade de inibidor de proteases do tipo serpina, que é capaz de inibir a síntese da interleucina-1 β . Este gene pode portanto ser utilizado para diminuir localmente a concentração de interleucina-1 β e assim reduzir o desenvolvimento da resposta imunitária e inflamatória.



O gene BCRF1 do vírus de Epstein Barr codifica para um análogo da interleucina 10. O produto deste gene é uma citóquina capaz de diminuir a resposta imunitária e de modificar a sua especificidade, induzindo a proliferação de linfócitos B.

O gene US28 do citomegalovírus codifica para uma proteína homóloga ao receptor da proteína inflamatória dos macrófagos 1α (MIP- 1α). Esta proteína é portanto capaz de actuar como competidor dos receptores de MIP e assim inibir a sua actividade localmente.

O produto dos genes E3-14,7, E3-10,4 e E3-14,5 do adenovírus é capaz de bloquear a transmissão do sinal intercelular mediado por certas citóquinas. Quando as citóquinas se ligam aos seus receptores na superfície de uma célula infectada, é transmitido um sinal ao núcleo para induzir a morte celular ou parar a síntese proteica. É o caso em particular do factor de necrose tumoral (TNF). A incorporação dos genes E3-14,7, E3-10,4 e/ou E3-14,5 num ADN recombinante segundo o presente invento com o objectivo da sua expressão constitutiva ou regulada permite bloquear a sinalização intercelular induzida pelo TNF e proteger assim as células infectadas pelos vírus recombinantes do presente invento dos efeitos tóxicos desta citóquina.

Uma inibição local e transitória pode ser particularmente vantajosa. Esta pode ser obtida nomeadamente pela escolha de determinados sinais de expressão (promotores dependentes de citóquinas por exemplo) como posteriormente indicado.

Entenda-se que outros genes homólogos ou possuindo propriedades funcionais semelhantes podem ser utilizados para a construção dos vectores do presente invento. Estes diferentes genes podem ser obtidos por quaisquer técnicas conhecidas dos peritos na arte e nomeadamente por pesquisa de bancos, por síntese química ou ainda por métodos mistos que incluam a modificação química ou enzimática de sequências obtidas por pesquisa de bancos. Por outro lado, estes diferentes genes podem ser utilizados sozinhos ou em combinação(ões).



A inserção dos genes considerados sob a forma de ADN recombinantes segundo o presente invento oferece uma maior flexibilidade na construção de adenovírus e permite um melhor controlo da expressão dos referidos genes.

Assim, os ADN recombinantes (e portanto os dois genes de interesse) incorporados nos vectores adenovirais segundo o presente invento podem ser dispostos de diferentes maneiras.

Podem em primeiro lugar ser inseridos num mesmo local do genoma do adenovírus ou em locais diferentes, seleccionados. Em particular, os ADN recombinantes podem ser inseridos pelo menos em parte ao nível das regiões E1, E3 e/ou E4 do genoma do adenovírus, em substituição ou como suplemento das sequências virais.

De preferência, os ADN recombinantes são inseridos, pelo menos em parte, ao nível das regiões E1, E3 ou E4 do genoma do adenovírus. Quando são inseridos em dois locais diferentes, preferimos, no âmbito do presente invento, utilizar as regiões E1 e E3 ou E1 e E4. Os exemplos mostram com efeito que esta organização permite uma expressão elevada dos dois genes, sem interferência entre os dois. Vantajosamente, os ADN recombinantes são inseridos em substituição das sequências virais.

Estes ADN recombinantes podem em seguida comportar, cada um, um promotor transcricional, idêntico ou diferente. Esta configuração permite obter níveis de expressão superiores e oferece um melhor controlo de expressão dos genes. Neste caso, os dois genes podem ser inseridos com mesma orientação ou com orientações opostas.

Estes podem igualmente constituir uma entidade transcricional única. Nesta configuração, os dois ADN recombinantes são contíguos e posicionados de tal forma que os dois genes fiquem sob o controlo de um único promotor, e dêem lugar a um único ARN pré-mensageiro. Esta disposição é vantajosa uma vez que permite utilizar um único promotor transcricional.

Finalmente, o emprego de ADN recombinantes segundo o presente invento permite utilizar promotores transcripcionais de natureza diferente e



nomeadamente promotores fortes ou fracos, regulados ou constitutivos, específicos do tecido ou ubiquitários, etc.

A escolha dos sinais de expressão e da posição respectiva dos ADN recombinantes é particularmente importante para obter uma expressão elevada do gene terapêutico e um efeito imunoprotector importante.

Uma concretização preferida do presente invento emprega um adenovírus defectivo comportando um primeiro ADN recombinante contendo um gene terapêutico e um segundo ADN recombinante contendo um gene imunoprotector, no qual os dois ADN recombinantes são inseridos ao nível da região E1.

Uma concretização particularmente preferida do presente invento emprega um adenovírus defectivo comportando um primeiro ADN recombinante contendo um gene terapêutico, inserido ao nível da região E1, e um segundo ADN recombinante contendo um gene imunoprotector, inserido ao nível da região E3.

Como aqui indicado adiante, os adenovírus do presente invento são defectivos, isto é, são incapazes de replicar de forma autónoma na célula alvo. Geralmente, o genoma dos adenovírus defectivos segundo o presente invento é portanto desprovido pelo menos das sequências necessárias à replicação do referido vírus na célula infectada. Estas regiões podem ser eliminadas (no todo ou em parte), ou tornadas não-funcionais, ou substituídas por outras sequências e nomeadamente pelos genes terapêuticos. O carácter defectivo dos adenovírus do presente invento é um elemento importante, uma vez que assegura a não disseminação dos vectores do presente invento após administração.

Numa concretização preferida, os adenovírus do presente invento compreendem as sequências ITR e uma sequência que permite a encapsidação, e possuem uma deleção de todo ou parte do gene E1.

As sequências invertidas repetidas (ITR) constituem a origem da replicação dos adenovírus. Encontram-se localizadas nas extremidades 3' e 5' do genoma viral (Ver figura 1), donde podem ser facilmente isoladas segundo as técnicas clássicas de biologia molecular conhecidas do perito na arte. A

sequência nucleotídica das sequências ITR dos adenovírus humanos (em particular dos serotipos Ad2 e Ad5) está descrita na literatura, assim como dos adenovírus caninos (nomeadamente CAV1 e CAV2). No que diz respeito ao adenovírus Ad5 por exemplo, a sequência ITR esquerda corresponde à região que compreende os nucleótidos 1 a 103 do genoma.

A sequência de encapsidação (igualmente designada sequência Psi) é necessária à encapsidação do ADN viral. Esta região deve portanto estar presente para permitir a preparação dos adenovírus recombinantes defectivos segundo o presente invento. A sequência de encapsidação está localizada no genoma dos adenovírus, entre a ITR esquerda (5') e o gene E1 (Ver figura 1). Pode ser isolada ou sintetizada artificialmente através das técnicas clássicas da biologia molecular. A sequência nucleotídica da sequência de encapsidação dos adenovírus humanos (em particular dos serotipos Ad2 e Ad5) está descrita na literatura, assim como dos adenovírus caninos (nomeadamente CAV1 e CAV2). No que diz respeito ao adenovírus Ad5 por exemplo, a sequência de encapsidação corresponde à região que compreende os nucleótidos 194 a 358 do genoma.

De maior preferência, os adenovírus do presente invento compreendem as sequências ITR e uma sequência que permite a encapsidação, e possuem uma deleção da totalidade ou parte dos genes E1 e E4.

Numa concretização particularmente preferida, o genoma dos adenovírus segundo o presente invento tem delecionado a totalidade ou parte dos genes E1, E3 e E4, e, ainda de maior preferência, da totalidade ou parte dos genes E1, E3, L5 e E4.

Os adenovírus do presente invento podem ser preparados a partir de adenovírus de origens diversas. Existem com efeito diferentes serotipos de adenovírus, cuja estrutura e propriedades variam um pouco, mas que apresentam uma organização genética comparável. Assim, os ensinamentos descritos no presente pedido podem ser facilmente reproduzidos pelo perito na arte para todo o tipo de adenovírus.

Mais particularmente, os adenovírus do presente invento podem ser de origem humana, animal ou mista (humana e animal).

No que diz respeito aos adenovírus de origem humana, preferimos utilizar os classificados no grupo C. De maior preferência, entre os diferentes serotipos de adenovírus humanos, preferimos utilizar no âmbito do presente invento os adenovírus do tipo 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5).

Tal como indicado mais acima, os adenovírus do presente invento podem igualmente ser de origem animal ou comportar sequências oriundas de adenovírus de origem animal. A requerente do pedido demonstrou com efeito que os adenovírus de origem animal são capazes de infectar com uma grande eficácia as células humanas e que são incapazes de se propagar nas células humanas nas quais foram testados (Ver pedido FR 93 05954). A requerente do pedido mostrou igualmente que os adenovírus de origem animal não são de modo algum trans-complementados por adenovírus de origem humana, o que elimina qualquer risco de recombinação e de propagação *in vivo*, na presença de um adenovírus humano, podendo conduzir à formação de uma partícula infecciosa. A utilização de adenovírus ou de regiões de adenovírus de origem animal é pois particularmente vantajosa visto que os riscos inerentes à utilização de vírus como vectores em terapia génica são ainda mais fracos.

Os adenovírus de origem animal utilizáveis no âmbito do presente invento podem ser de origem canina, bovina, de murídeo (exemplo: Mav1, Beard *et al.*, *Virology* 75 (1990) 81), ovina, suína, avícola ou ainda símia (exemplo: SAV). Mais particularmente, entre os adenovírus avícolas, podemos citar os serotipos 1 a 10 acessíveis na ATCC, como por exemplo as estirpes Phelps (ATCC VR-432), Fontes (ATCC VR-280), P7-A (ATCC VR-827), IBH-2A (ATCC VR-828), J2-A (ATCC VR-829), T8-A (ATCC VR-830), K-11 (ATCC VR-921) ou ainda as estirpes referenciadas ATCC VR-831 a 835. Entre os adenovírus bovinos, podemos utilizar os diferentes serotipos conhecidos, e nomeadamente os disponíveis na ATCC (tipos 1 a 8) sob as referências ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 e 769. Podemos igualmente citar os adenovírus de murídeo FL (ATCC VR-550) e E20308 (ATCC VR-528), o adenovírus ovino de tipo 5 (ATCC VR-1343) ou de tipo 6 (ATCC VR-1340); os adenovírus suínos 5359, ou os adenovírus símios tais como nomeadamente os adenovírus referenciados na ATCC sob os números VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.



De preferência, entre os diferentes adenovírus de origem animal, utilizamos no âmbito do presente invento adenovírus ou regiões de adenovírus de origem canina, e nomeadamente quaisquer estirpes de adenovírus CAV2 [estirpe manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) por exemplo]. Os adenovírus caninos têm sido objecto de numerosos estudos estruturais. Deste modo, os mapas de restrição completos dos adenovírus CAV1 e CAV2 foram descritos na arte anterior (Spibey *et al.*, *J. Gen. Virol.* 70 (1989) 165), e os genes E1a, E3 assim como as sequências IIR foram clonadas e sequenciadas (ver nomeadamente Spibey *et al.*, *Virus Res.* 14 (1989) 241; Linné, *Virus Res.* 23 (1992) 119, WO 91:11525).

Os adenovírus recombinantes defectivos segundo o presente invento podem ser preparados de diferentes formas.

Um primeiro método consiste em transfectar o ADN do vírus recombinante defectivo preparado *in vitro* (quer por ligação, quer sob a forma de plasmídeo) para uma linha celular competente, isto é, contendo em *trans* todas as funções necessárias à complementação do vírus defectivo. Estas funções são de preferência integradas no genoma da célula, o que permite evitar os riscos de recombinação e confere uma estabilidade acrescida à linha celular.

Uma segunda abordagem consiste em co-transfectar para uma linha celular apropriada o ADN do vírus recombinante defectivo preparado *in vitro* (quer por ligação, quer sob a forma de plasmídeo) e o ADN de um vírus ajudante. Segundo este método, não é necessário dispor de uma linha celular competente capaz de complementar todas as funções defectivas do adenovírus recombinante. Uma parte destas funções é com efeito complementada pelo vírus ajudante. Este vírus ajudante deve ele próprio ser defectivo e a linha celular possui em *trans* as funções necessárias à sua complementação. Entre as linhas celulares utilizáveis nomeadamente no âmbito desta segunda abordagem, podemos citar nomeadamente a linha de rim embrionário humano 293, as células KB, as células Hela, MDCK, GHK, etc. (ver exemplos).

Em seguida, os vectores que se multiplicaram são recuperados, purificados e amplificados segundo as técnicas clássicas de biologia molecular.



Segundo uma variante de execução, é possível preparar *in vitro*, quer por ligação quer sob a forma de plasmídeo, o ADN do vírus recombinante defectivo possuindo as deleções apropriadas e os dois ADN recombinantes. Tal como aqui adiante indicado, os vectores do presente invento possuem vantajosamente uma deleção da totalidade ou parte de certos genes virais, nomeadamente os genes E1, E3, E4 e/ou L5. Esta deleção pode corresponder a qualquer supressão que afecte o gene considerado. Pode tratar-se nomeadamente da supressão de toda ou de parte da região de codificação do referido gene e/ou de toda ou parte da região promotora da transcrição do referido gene. A supressão é geralmente realizada no ADN do vírus recombinante defectivo, por exemplo por digestão através de enzimas de restrição apropriadas, depois ligação, segundo as técnicas de biologia molecular, tal como ilustrado nos exemplos. Os ADN recombinantes podem em seguida ser inseridos neste ADN por clivagem enzimática seguida de ligação, ao nível das regiões seleccionadas e com a orientação escolhida.

O ADN assim obtido, que transporta portanto as deleções apropriadas e os dois ADN recombinantes, permite gerar directamente o adenovírus recombinante defectivo transportando as referidas deleções e ADN recombinantes. Esta primeira variante está particularmente adaptada à realização de adenovírus recombinantes nos quais os genes estão dispostos sob a forma de uma unidade transcricional única ou sob controlo de promotores separados mas inseridos num mesmo local do genoma.

É igualmente possível preparar o vírus recombinante em duas etapas, permitindo a introdução sucessiva dos dois ADN recombinantes. Deste modo, é construído o ADN de um primeiro vírus recombinante transportando as deleções apropriadas (ou uma parte das referidas deleções) e um dos ADN recombinantes, por ligação ou sob a forma de plasmídeo. Este ADN é em seguida utilizado para gerar um primeiro vírus recombinante transportando as referidas deleções e um ADN recombinante. O ADN deste primeiro vírus é em seguida isolado e co-transfectado com um segundo plasmídeo ou o ADN de um segundo vírus recombinante defectivo transportando o segundo ADN recombinante, as deleções apropriadas (parte não presente no primeiro vírus) e uma região que permita a recombinação homóloga. Esta segunda etapa gera deste modo o vírus recombinante defectivo transportando os dois ADN recombinantes. Esta variante de preparação é particularmente apropriada para a



preparação de vírus recombinantes transportando dois ADN recombinantes inseridos em duas regiões diferentes do genoma do adenovírus.

Os dois agentes segundo o presente invento, a saber o imunossupressor e o adenovírus recombinante, podem ser formulados com vista a uma administração por via tópica, oral, parentérica, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutânea, intraocular, transdérmica, etc.

De preferência, a fórmula ou as fórmulas farmacêuticas respectivas contêm veículos farmacêuticamente aceitáveis para uma fórmula injectável. Pode tratar-se em particular de soluções salinas (fosfato monossódico, dissódico, cloreto de sódio, potássio, cálcio ou magnésio, etc., ou misturas destes sais) estéreis, isotónicas, ou de composições secas, nomeadamente liofilizadas, que, por adição água esterilizada ou de soro fisiológico, conforme o caso, permitem a constituição de solutos injectáveis.

As doses de imunossupressor e de adenovírus utilizadas para a injeção podem ser adaptadas em função de diferentes parâmetros e nomeadamente em função do modo de administração utilizado, da patologia envolvida, do gene a expressar ou ainda da duração do tratamento procurado.

De uma maneira geral, os adenovírus recombinantes segundo o presente invento são formulados e administrados sob a forma de doses compreendidas entre 10^4 e 10^{14} pfu/ml, e de preferência 10^6 e 10^{10} pfu/ml. O termo pfu ("plaque forming unit") corresponde ao poder infeccioso de uma solução considerada e é determinado pela infecção de uma cultura celular apropriada e medição, geralmente após 5 dias, do número de placas de células infectadas. As técnicas de determinação do título em pfu de uma solução viral estão bem documentadas na literatura. No que diz respeito mais particularmente aos imunossupressores, as suas doses e modos de injeção variam segundo a sua natureza. O ajustamento destes dois parâmetros faz parte das competências do perito na arte.

A associação medicamentosa segundo as reivindicações 1 a 25 pode ser utilizada para o tratamento ou prevenção de numerosas patologias. Conforme o gene terapêutico inserido no seu adenovírus, esta pode ser utilizada nomeadamente para o tratamento ou prevenção de doenças genéticas (distrofia,

muscoviscidose, etc.), de doenças neurodegenerativas (alzheimer, parkinson, ALS, etc.), de patologias hiperproliferativas (cancro, estenose recidiva, etc.), de patologias ligadas a desordens da coagulação ou a dislipoproteinémias, de patologias ligadas a infecções virais (hepatites, SIDA, etc.), etc.

O presente invento será mais completamente descrito com a ajuda dos exemplos que se seguem, que devem ser considerados como ilustrativos e não limitativos.

Figura 1 : Organização genética do adenovírus Ad5. A sequência completa do Ad5 está disponível em base de dados e permite ao perito na arte seleccionar ou criar qualquer local de restrição e deste modo isolar qualquer região do genoma.

Figura 2 : Mapa de restrição do adenovírus CAV2 estirpe Manhattan (segundo Spibey *et al.* supracitado).

Figura 3 : Construção do vector pAD5-gp19k-βgal.

Figura 4 : Construção do adenovírus Ad-gp19k-βgal,ΔE1,ΔE3.

Técnicas gerais de biologia molecular

Os métodos classicamente utilizados em biologia molecular tais como as extracções preparativas de ADN plasmídico, a centrifugação de ADN plasmídico em gradiente de cloreto de cézio, a electroforese em géis de agarose ou acrilamida, a purificação de fragmentos de ADN por electroeluição, as extracções de proteínas com fenol ou fenol-clorofórmio, a precipitação de ADN em meio salino pelo etanol ou pelo isopropanol, a transformação para *Escherichia coli*, etc. são bem conhecidas do perito na arte e estão abundantemente descritas na literatura [Maniatis T. *et al.*, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. *et al.* (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Os plasmídeos do tipo pBR322, pUC e os fagos da série M13 são de origem comercial (Bethesda Research Laboratories).

Para as ligações, os fragmentos de ADN podem ser separados segundo o seu tamanho por electroforese em géis de agarose ou acrilamida, extraídos com fenol ou com uma mistura fenol/clorofórmio, precipitados em etanol, depois incubados na presença da ADN-ligase do fago T4 (Biolabs) conforme as recomendações do fornecedor.

O preenchimento das extremidades 5' proeminentes pode ser efectuado pelo fragmento de Klenow da ADN-Polimerase I de *E. coli* (Biolabs) conforme as especificações do fornecedor. A destruição das extremidades 3' proeminentes é efectuada na presença da ADN-polimerase do fago T4 (Biolabs) utilizada segundo as recomendações do fabricante. A destruição das extremidades 5' proeminentes é efectuada através de um tratamento efectuado pela nuclease S1.

A mutagénese dirigida *in vitro* por oligodesoxinucleótidos sintéticos pode ser efectuada segundo o método desenvolvido por Taylor *et al.* [*Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 8749-8764] utilizando o estojo distribuído por Amersham.

A amplificação enzimática de fragmentos de ADN pela técnica referida como PCR [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. *et al.*, *Science* 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. e Faloona F.A., *Meth. Enzym.* 155 (1987) 335-350] pode ser efectuada utilizando um "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) conforme as especificações do fabricante.

A verificação das sequências nucleotídicas pode ser efectuada pelo método desenvolvido por Sanger *et al.* [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 5463-5467] utilizando o estojo distribuído por Amersham.

Linhas celulares utilizadas

Nos exemplos que se seguem, as linhas celulares seguintes foram ou podem ser utilizadas:



- Linha de rim embrionário humano 293 (Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59). Esta linha contém nomeadamente, integrada no seu genoma, a parte esquerda do genoma do adenovírus humano Ad5 (12%).

- Linha de células humanas KB: proveniente de um carcinoma epidérmico humano, esta linha está acessível na ATCC (ref. CCL17) assim como as condições que permitem a sua cultura.

- Linha de células humanas Hela: proveniente de um carcinoma de epitélio humano, esta linha está acessível na ATCC (ref. CCL2) assim como as condições que permitem a sua cultura.

- Linha de células caninas MDCK: as condições de cultura das células MDCK foram descritas nomeadamente por Macatney *et al.*, *Science* 44 (1988) 9.

- Linha de células gm DBP6 (Brough *et al.*, *Virology* 190 (1992) 624). Esta linha é constituída por células Hela possuindo o gene E2 de adenovírus sob controlo da LTR de MMTV.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Construção de adenovírus recombinantes defectivos compreendendo um gene terapêutico (o gene LacZ de *E. coli*) sob o controlo do promotor da LTR do RSV e o gene gp19k sob o controlo do promotor da LTR do RSV, ambos inseridos ao nível da região E1.

Estes adenovírus foram construídos por recombinação homóloga entre um plasmídeo possuindo a parte esquerda do adenovírus Ad5, os dois ADN recombinantes e uma região do adenovírus Ad5 (correspondendo à proteína IX) e o ADN de um adenovírus defectivo possuindo diferentes deleções.

1. Construção do vector pAD5-gp19k-βgal (figura 3)

1.1 Construção do plasmídeo pGEM-gp19k

O plasmídeo pAD5-gp19k-βgal contém uma sequência de ADNc que codifica para a proteína gp19k de adenovírus. Este plasmídeo foi construído do seguinte modo. O fragmento *Xba*I do genoma do adenovírus Ad5 selvagem contendo a região E3 foi isolado e clonado no local correspondente do plasmídeo pGEM (Promega) para dar origem ao plasmídeo pGEM-E3. O

fragmento *Hinfl* contendo a sequência que codifica a gp19k (nucleótidos 28628 a 29634 do adenovírus Ad5 selvagem) foi em seguida isolado a partir do plasmídeo pGEM-E3. As extremidades deste fragmento foram tornadas lisas pela acção do fragmento de Klenow da ADN-polimerase I de *E. coli* (Ver técnicas gerais de biologia molecular), depois o fragmento obtido foi clonado no local *SmaI* do plasmídeo pGEMzf+ (promega).

O plasmídeo obtido foi designado pGEM-gp19k (figura 3).

1.2. Construção do vector pAD5-gp19k-βgal

Este exemplo descreve a construção de um plasmídeo contendo um dos dois ADN recombinantes compreendendo o seu próprio promotor, a parte esquerda do genoma do adenovírus e uma parte suplementar (proteína pIX) que permite a recombinação homóloga. Este vector foi construído a partir do plasmídeo pAd.RSVβGal do seguinte modo.

O plasmídeo pAd.RSVβGal contém, na orientação 5'→3',

- o fragmento *PvuII* correspondente à extremidade esquerda do adenovírus Ad5 compreendendo: a sequência ITR, a origem de replicação, os sinais de encapsidação e o amplificador E1A;

- o gene que codifica para a β-galactosidase sob o controlo do promotor RSV (do vírus do sarcoma de Rous);

- um segundo fragmento do genoma do adenovírus Ad5, que permite a recombinação homóloga entre o plasmídeo pAd.RSVβGal e o adenovírus d1324. O plasmídeo pAd.RSVβGal foi descrito por Stratford-Perricaudet *et al.* (*J. Clin. Invest.* 90 (1992) 626).

O plasmídeo pAd.RSVβGal foi primeiramente cortado pelas enzimas *EagI* e *Clal*. Isto gera um primeiro fragmento possuindo nomeadamente a parte esquerda do adenovírus Ad5 e o promotor da LTR do RSV. Paralelamente, o plasmídeo pAd.RSVβGal foi igualmente cortado pelas enzimas *EagI* e *XbaI*. Isto gera um segundo tipo de fragmento possuindo nomeadamente o promotor da LTR do RSV, o gene LacZ e um fragmento do genoma do adenovírus Ad5, que permite a recombinação homóloga. Os fragmentos *Clal-EagI* e *EagI-XbaI* foram em seguida ligados na presença do fragmento *XbaI-Clal* do plasmídeo pGEM-gp19k (exemplo 1.1) possuindo a sequência que codifica a gp19k (Ver

figura 3). O vector assim obtido, designado por pAD5-gp19k- β gal, contém portanto

- o fragmento *PvuII* correspondente à extremidade esquerda do adenovírus Ad5 compreendendo: a sequência ITR, a origem de replicação, os sinais de encapsidação e o amplificador E1A;
- a sequência que codifica para a gp19k sob o controlo do promotor RSV (do vírus do sarcoma de Rous);
- o gene que codifica para a β -galactosidase sob o controlo do promotor RSV (do vírus do sarcoma de Rous), e
- um segundo fragmento do genoma do adenovírus Ad5, que permite a recombinação homóloga.

2. Construção de adenovírus recombinantes

2.1. Construção de um adenovírus recombinante delecionado na região E1, possuindo os dois ADN recombinantes inseridos na mesma orientação, ao nível da região E1.

O vector pAD5-gp19k- β gal foi linearizado e co-transfectado com um vector adenoviral deficiente no gene E1, para as células ajudantes (linha 293) possuindo em *trans* as funções codificadas pelas regiões E1 (E1A e E1B) de adenovírus.

Mais precisamente, o adenovírus Ad-gp19k- β gal, Δ E1 é obtido por recombinação homóloga *in vivo* entre o adenovírus Ad-RSV β gal (Ver Stratford-Perricaudet *et al.* supracitado) e o vector pAD5-gp19k- β gal, segundo o seguinte protocolo: o plasmídeo pAD5-gp19k- β gal, linearizado por *XmnI*, e o adenovírus Ad-RSV β gal, linearizado pela enzima *ClaI*, são co-transfectados para a linha 293 na presença de fosfato de cálcio, para permitir a recombinação homóloga. Os adenovírus recombinantes assim gerados são em seguida seleccionados por purificação em placa. Após isolamento, o ADN do adenovírus recombinante é amplificado na linha celular 293, o que conduz a um sobrenadante de cultura contendo o adenovírus defectivo recombinante não purificado com um título de aproximadamente 10^{10} pfu/ml.

As partículas virais são geralmente purificadas por centrifugação em gradiente de cloreto de céσιο segundo as técnicas conhecidas (ver



nomeadamente Graham *et al.*, *Virology* 52 (1973) 456). O adenovírus Ad-gp19k-βgal,ΔE1 pode ser conservado a -80°C em 20% de glicerol.

2.2. Construção de um adenovírus recombinante delecionado nas regiões E1 e E3, possuindo os dois ADN recombinantes inseridos na mesma orientação, ao nível da região E1 (figura 4).

O vector pAD-gp19k-βgal foi linearizado e co-transfectado com um vector adenoviral deficiente nos genes E1 e E3, para as células ajudantes (linha 293) possuindo em *trans* as funções codificadas pelas regiões E1 (E1A e E1B) de adenovírus.

Mais precisamente, o adenovírus Ad-gp19k-βgal,ΔE1,ΔE3 foi obtido por recombinação homóloga *in vivo* entre o adenovírus mutante Ad-dl1324 (Thimmappaya *et al.*, *Cell* 31 (1982) 543) e o vector pAD5-gp19k-βgal, segundo o seguinte protocolo: o plasmídeo pAD5-gp19k-βgal e o adenovírus Ad-dl1324, linearizados pela enzima *Clal*, foram co-transfectados para a linha 293 na presença de fosfato de cálcio, para permitir a recombinação homóloga. Os adenovírus recombinantes assim gerados foram em seguida seleccionados por purificação em placa. Após isolamento, o ADN do adenovírus recombinante é amplificado na linha celular 293, o que conduz a um sobrenadante de cultura contendo o adenovírus defectivo recombinante não purificado com um título de aproximadamente 10^{10} pfu/ml.

As partículas virais são geralmente purificadas por centrifugação em gradiente de cloreto de cézio segundo as técnicas conhecidas (ver nomeadamente Graham *et al.*, *Virology* 52 (1973) 456). O genoma do adenovírus recombinante foi em seguida verificado por análise "Southern blot". O adenovírus Ad-gp19k-βgal,ΔE1,ΔE3 pode ser conservado a -80°C em 20% de glicerol.

Exemplo 2: Evidência da actividade imunoprotectora da associação medicamentosa segundo o presente invento.

60 ratinhos adultos fêmeas DBA/2 são repartidos ao acaso por 6 grupos de 10 ratinhos tratados respectivamente segundo os seguintes protocolos de injeção:

- GRUPO 1a:

Recebe uma injeção intraocular de 10 µg de anticorpos monoclonais anti-CD3 nos dias -2, -1, 1, 2, 3, 4 e 5 com, no dia 0, uma injeção intravenosa de 4×10^9 pfu de vírus Ad-RSVβgal (Ver Stratford-Perricaudet *et al.* supracitado).

- GRUPO 1b:

Recebe o mesmo tratamento que o grupo 1a utilizando como vírus, 4×10^9 pfu de vírus Ad-gp19k-βgal (figura 4).

- GRUPO 2a:

Recebe uma injeção intraperitoneal de 250 µg de anticorpos monoclonais anti-CD4 nos dias -2, -1, 1, 4, 7 com, no dia 0, uma injeção intravenosa de 4×10^9 pfu de vírus Ad-RSVβgal.

- GRUPO 2b:

Recebe o mesmo tratamento que o grupo 2a utilizando como vírus, 4×10^9 pfu de vírus Ad-gp19k-βgal.

- GRUPO 3a:

Recebe uma injeção intravenosa de 4×10^9 pfu de Ad-βgal sem administração conjunta de imunossupressor.

- GRUPO 3b:

Recebe uma injeção intravenosa de 4×10^9 pfu de Ad-gp19k-βgal sem administração conjunta de imunossupressor.

Em tempos diferentes, dois animais de cada grupo foram sacrificados com a finalidade de retirar o fígado e o baço.

2.1. – Análise por imunofluorescência da repartição das principais sub-populações linfocitárias (CD3+, CD4+ e CD8+) nos esplenócitos retirados no D15 após a injeção.

Uma suspensão de células isoladas foi preparada a partir dos baços retirados. Uma amostra de células foi analisada por imunofluorescência, com a

ajuda de anticorpos específicos para cada sub-população linfocitária. A leitura das células fluorescentes foi efetuada graças a um citofluorómetro (FACS Scan-Becton Dickinson). O quadro I que se segue mostra os resultados.

	Grupo 3a Ad- β gal		Grupo 3b Ad- β gal- gp19k		Grupo 1a anti-CD3/ Ad- β gal		Grupo 2a anti-CD4/ Ad- β gal	
	% de células que expressam β gal na superfície celular							
CD3	20,0	17,5	20,6	21	5,4	6,1	12	10,3
CD4	13,4	12,6	15,3	16,8	4,4	5,1	2,7	4,1
CD8	5,5	5,5	6,1	6	2,02	2,3	7,9	6,6

QUADRO I

Nota-se a diminuição clara das células CD3+, CD4+ e CD8+ nos animais tratados com anti-CD3 e a diminuição selectiva das células CD4+ nos animais tratados com anti-CD4.

2.2. - Análise da capacidade citotóxica dos esplenócitos retirados no D32 após a injeccão e estimulados *in vitro* na presença de alvos histocompatíveis expressando a β -gal

Uma segunda amostra de esplenócitos isolados a partir dos baços dos animais tratados foi cultivada *in vitro* durante 4 dias na presença de células P815 expressando a β galactosidade à sua superfície. No fim da cultura, a actividade citotóxica dos esplenócitos face aos alvos P815- β gal marcados com Cr⁵¹ foi avaliada. A actividade citotóxica, expressa pela percentagem de citólise, foi determinada de modo convencional pondo células efectoras na presença de células alvo em diferentes proporções. Os resultados são apresentados no quadro II que se segue.

Grupo	2b	3A
Tratamento	Anti-CD4/ Ad-βgal-gp19k	AD-βgal
Proporção efectora/alvos	% de citólise	
80/1	4 2	13 14
40/1	2 1	13 9
20/1	1 1	5 9
10/1	0 0	2 5
5/1	0 1	1 2

Os esplenócitos, retirados dos animais que receberam o tratamento com anti-CD4, isto é o grupo 2b, mostram uma neutralização muito clara da sua capacidade citotóxica.

QUADRO II

2.3. Expressão da actividade de βgalactosidase no fígado após 15 e 32 dias.

Os fígados são seccionados e corados com X-gal para revelar a actividade de βgalactosidase e de eosina para pôr em evidência a histologia da secção. Os resultados são apresentados no quadro III que se segue.

	<u>Número de células expressando βgal</u>	
	15 dias	32 dias
Grupo 2a: (anti-CD4/Ad-βgal)	1	1
Grupo 2b: (anti-CD4/Ad-gp19k-βgal)	250	50
Grupo 3a: (Ad-βgal)	3	0
Grupo 3b: (Ad-gp19k-βgal)	25	0

QUADRO III

Dos resultados acima apresentados, sobressai que a injeção de anticorpos anti-CD4 associada a uma injeção de Adgp19k-βgal induziu uma expressão claramente prolongada do gene considerado. É assim que 30 dias após as injeções, observamos no caso do grupo 2b uma actividade de β-galactosidase significativa. Este prolongamento que pode ser interpretado como a consequência de um fenómeno de tolerância induzida segundo o presente invento é claramente superior ao que podia ser esperado da simples justaposição dos efeitos respectivos do imunossupressor anti-CD4 e do adenovírus recombinante Adgp19k-βgal.

Nenhuma reacção inflamatória nem qualquer outra foram observadas neste período de 30 dias no caso do grupo 2b.

Lisboa,

22.11.1995

Por AVENTIS PHARMA S.A. e INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO



Eng.º ANTÓNIO JOÃO DA CUNHA FERREIRA Ag. Of. Pr. Ind. Rua das Flores, 74-4.º 1200-195 LISBOA
--

REIVINDICAÇÕES

1. Associação medicamentosa de pelo menos um agente imunossupressor e pelo menos um adenovírus recombinante defectivo cujo genoma compreende um primeiro ADN recombinante contendo um gene terapêutico e um segundo ADN recombinante contendo um gene imunoprotector, para uma utilização consecutiva, intermitente e/ou simultânea no tempo, útil para transfecções exogénicas *in vivo* e/ou *ex vivo*.

2. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 1 caracterizada por o agente imunossupressor ser de preferência escolhido de entre a ciclosporina, o FK506, a azatioprina, os corticosteróides e os anticorpos mono- ou policlonais.

3. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 2 caracterizada por tratar-se de anticorpos capazes de inactivar moléculas imunitárias ou de provocar a destruição das células imunitárias possuindo essas moléculas.

4. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 3 caracterizada por os anticorpos serem escolhidos de entre os anti-CD4, -CD2, -CD3, -CD8, -CD28, -B7, -ICAM-1, -LFA-1 e a CTLA4lg.

5. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por o gene terapêutico codificar para uma proteína terapêutica.

6. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações 1 a 4 caracterizada por o gene terapêutico codificar para um ARN terapêutico.

7. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por o gene imunoprotector ser um gene cujo produto actua sobre a actividade do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou sobre a actividade das citóquinas.

8. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 7 caracterizada por o gene imunoprotector ser um gene cujo produto inibe pelo menos parcialmente a expressão de proteínas do MHC ou a apresentação antigénica.

9. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por o gene imunoprotector ser escolhido de entre o gene da

gp19k do adenovírus, o gene ICP47 do vírus do herpes ou o gene UL18 do citomegalovírus.

10. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por os dois ADN recombinantes do genoma do adenovírus constituírem uma entidade transcricional única.

11. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações 1 a 9 caracterizada por os dois ADN recombinantes possuírem, cada um, um promotor transcricional, idêntico ou diferente.

12. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 11 caracterizada por os dois ADN recombinantes estarem inseridos com a mesma orientação.

13. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 11 caracterizada por os dois ADN recombinantes estarem inseridos com orientações opostas.

14. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por os dois ADN recombinantes estarem inseridos num mesmo local do genoma do adenovírus, de preferência ao nível das regiões E1, E3 ou E4.

15. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 14 caracterizada por os dois ADN recombinantes estarem inseridos ao nível da região E1.

16. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações 1 a 13 caracterizada por os dois ADN recombinantes estarem inseridos em locais diferentes do genoma do adenovírus.

17. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 16 caracterizada por um dos ADN recombinantes estar inserido ao nível da região E1 e o outro ao nível da região E3 ou E4.

18. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por o adenovírus ser um adenovírus recombinante defectivo compreendendo as sequências ITR, uma sequência que permita a encapsidação, e possuindo uma deleção da totalidade ou parte dos genes E1 e E4.

19. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 18 caracterizada por tratar-se de um adenovírus compreendendo as sequências ITR, uma sequência que permita a encapsidação e possuindo uma deleção da totalidade ou parte dos genes E1, E3 e E4.

20. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações 1 a 19 caracterizada por tratar-se de um adenovírus cujo genoma está delecionado da totalidade ou parte dos genes E1, E3, L5 e E4.

21. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por o adenovírus recombinante ser de origem humana, animal ou mista.

22. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 21 caracterizada por os adenovírus recombinantes de origem humana serem escolhidos de entre os classificados no grupo C, de preferência de entre os adenovírus recombinantes do tipo 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5).

23. Associação medicamentosa segundo a reivindicação 21 caracterizada por os adenovírus de origem animal serem escolhidos de entre os adenovírus de origem canina, bovina, de murídeo, ovina, suína, avícola e símia.

24. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações anteriores caracterizada por o agente imunossupressor ser injectado antes e após a injeção do adenovírus.

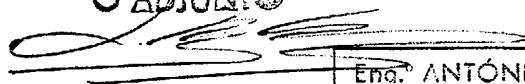
25. Associação medicamentosa segundo uma das reivindicações 1 a 23 caracterizada por o agente imunossupressor e o adenovírus recombinante serem injectados simultaneamente.

Lisboa, 22.10.2004

Por AVENTIS PHARMA S.A. e INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

- O AGENTE OFICIAL -

○ ADJUNTO


Eng.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74-4.º
1200-195 LISBOA

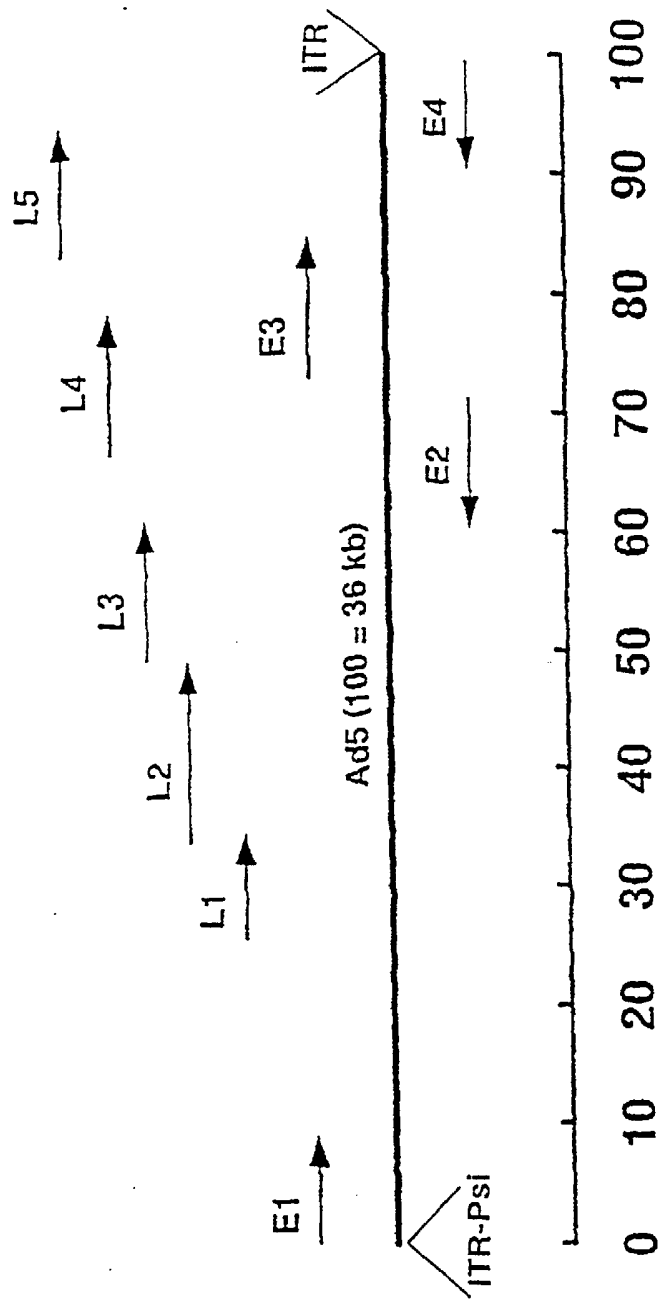


Figura 1

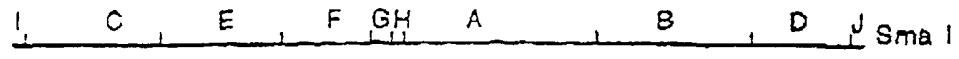
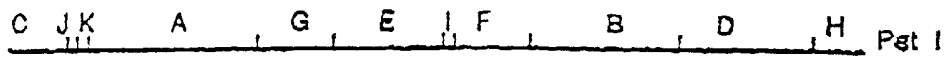


Figura 2

