INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 593755 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6 )
C12N015/86 A A61K048/00 B
C12N015/19 B C12N015/26 B
C12N005/06 B A61K035/12 B

(12) ***FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO***

(22) *Data de depósito:* 1993.03.16

(30) *Prioridade:* 1992.03.16 FR 9203120

(43) *Data de publicação do pedido:*
1994.04.27

(45) *Data e BPI da concessão:*
2001.09.19

(73) *Titular(es):*
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
15, QUAI ANATOLE FRANCE 75007 PARIS FR

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
RUE CAMILLE DESMOULINS F-94805 VILLEJUIF CÉDEX FR

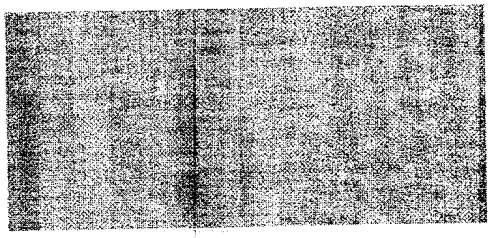
(72) *Inventor(es):*
MICHEL PERRICAUDET FR
HEDI HADDADA FR
THIERRY RAGOT FR

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* ADENOVÍRUS RECOMBINANTES DEFECTIVOS QUE EXPRESSAM CITÓQUINAS PARA O TRATAMENTO ANTITUMORAL

(57) *Resumo:*

ADENOVÍRUS RECOMBINANTES DEFECTIVOS QUE EXPRESSAM CITÓQUINAS PARA O TRATAMENTO ANTITUMORAL



DESCRIÇÃO

**"Adenovírus recombinantes defectivos que expressam citóquinas para o tratamento antitumoral"**

As citóquinas são moléculas (hormonas) produzidas por células em consequência de um estímulo antigénico ou de uma activação por outros factores. A primeira citóquina que foi produzida é a interleucina 1 (IL-1). Permite a activação das células T que por seu turno produzem toda uma gama de linfóquinas das quais algumas são indispensáveis para activar o sistema imunitário e as defesas contra as infecções virais ou parasitárias.

Desde alguns anos que as citóquinas são utilizadas em imunoterapia anticancerosa. Apesar disso, a sua administração pela via geral levanta um certo número de problemas. A IL-2, por exemplo, provoca efeitos secundários bastante importantes; é rapidamente metabolisada de forma que devem ser administradas repetidamente doses fortes.

Procuram-se portanto melhores vias de administração que aumentem a sua eficácia, diminuindo os seus efeitos indesejáveis.

WO-A-88/00971 divulga um vector recombinante comportando uma primeira sequência de nucleótidos, apta a ser expressa como polipéptido antigénico conjuntamente com uma segunda sequência de nucleótidos, apta a ser expressa, na totalidade ou em parte como uma linfóquina eficaz para melhorar a resposta imunitária contra o polipéptido antigénico. A página 14 descreve uma construção de réplicas conveniente.

Stratford-Perricaudet et al., Human J. Transfert 1991, vol. 219, pp 51-61 divulga vectores adenovirais que podem ser específicos de um tecido, por via indirecta de utilização de elementos reguladores específicos de um tecido.

EP-A-0 185 573 divulga a utilização de vectores adenovirais para a produção de HBsAg *in vitro*.

Russell S.J. Immunology Today, vol. 11 nº 6, 1990, pp. 196-200 é uma revisão de base que descreve os problemas da terapia por genes à base de linfóquinas e os diversos vectores disponíveis mas inoperantes quanto à sua utilização como sistemas de distribuição.

O invento tem portanto como objectivo a utilização de um adenovírus defectivo para a replicação que contém pelo menos uma inserção contendo uma sequência nucleica codificando pelo menos uma citóquina; esta inserção está sob o controlo de um promotor presente ou antecipadamente inserido no genoma do referido adenovírus para a preparação de medicamentos antitumorais. Assim, os adenovírus recombinantes defectivos utilizados segundo o invento expressam uma ou várias citóquinas, e são utilizados para a constituição de composições farmacêuticas, designadamente antitumorais, mais particularmente de composições directamente injectáveis nos tumores sólidos do hospedeiro.

Estes adenovírus recombinantes defectivos utilizados segundo o invento são caracterizados por comportarem um genoma de adenovírus não replicável, defectivo, no qual estão inseridas uma ou várias sequências de ácido nucleico codificando para uma ou várias citóquinas, designadamente linfóquinas, sob o controlo de um ou vários promotores susceptíveis de serem reconhecidos pelas polimerases de células humanas, mais particularmente de células tumorais humanas ou de células que infiltram os tumores.

O invento diz respeito mais particularmente à utilização de ácidos nucleicos recombinantes susceptíveis de serem postos em prática para a produção desses adenovírus recombinantes defectivos.

Tal ácido nucleico recombinante caracteriza-se por comportar, por um lado, uma sequência genómica de um adenovírus defectivo onde a sequência está desprovida das sequências necessárias à sua replicação, mas comportando no entanto as sequências que neste genoma são o suporte da informação genética necessária ao adenovírus correspondente para penetrar nas células infectáveis por este, assim como o conjunto das sequências essenciais necessárias à encapsidação deste adenovírus e, por outro lado, uma inserção contendo uma sequência nucleica codificante para uma citóquina, estando esta

inserção sob o controlo de um promotor presente ou antecipadamente inserido na acima citada sequência genómica.

Os adenovírus, designadamente os adenovírus do tipo 2 ou 5, susceptíveis de infectar os humanos (ou adenovírus humanos), ou ainda os adenovírus de serótipo 4 e 7, representam vectores particularmente preferidos no quadro do presente invento, por causa, designadamente, do grande tamanho do fragmento de ADN estranho que é possível inserir no genoma destes vírus.

Vantajosamente, a sequência ou as sequências de ácido nucleico da inserção acima mencionadas, codificantes para uma ou várias citóquinas predeterminadas, estão contidas num genoma defectivo de adenovírus desprovido de sequências nucleotídicas essenciais necessárias à replicação destes adenovírus e mais particularmente de transactivadores E1A e E1B e se necessário, da região E3 do adenovírus, ou ainda das suas regiões E1 e E3.

Por outras palavras, o invento aproveita a capacidade destes adenovírus recombinantes defectivos autorizarem a expressão da sequência de inserção que eles contêm, nas células que invadem, mesmo quando, por causa do seu carácter defectivo, eles aí não se multipliquem. Por outras palavras, o invento tem por objectivo fazer segregar as citóquinas no seio das próprias células do tumor a tratar (as próprias células tumorais e células, designadamente linfócitos, que infiltram estes tumores) quando estas foram infectadas pelos adenovírus defectivos, em particular quando estes são injectados directamente no tumor. As citóquinas produzidas activarão assim prioritariamente *in situ* as células citotóxicas que infiltram o tumor e as que se encontram na proximidade do tumor.

No que diz respeito à sequência de inserção no genoma do adenovírus recombinante defectivo, ela pode ser escolhida entre todas as células que expressam uma citóquina capaz de exercer um efeito, quer antitumoral directo, quer activador das células imunocompetentes do organismo, quer os dois simultaneamente.

Entre as citóquinas serão mencionadas a título de exemplo: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, interferão $\alpha$, interferão $\gamma$, "tumor necrosis factor" alfa (TNF $\alpha$) (factor alfa de necrose de tumor).

Os mesmos adenovírus recombinantes também podem ser utilizados no caso de certas doenças em que há uma deficiência imunitária e no caso de certas doenças parasitárias ou virais (em particular interferão $\gamma$, $\alpha$ e/ou GM-CSF), designadamente por administração pela via geral ou por intermédio de células, de preferência humanas tomadas num estado que autoriza a sua injecção no homem, tendo estas células sido previamente infectadas por um adenovírus defectivo recombinante de acordo com o invento.

Relembram-se a seguir as propriedades de algumas destas citóquinas.

Interleucina 1 (IL-1):

É produzida essencialmente pelos monócitos e pelos macrófagos activados. O seu peso molecular é de aproximadamente 17 quilodaltons. Apresenta várias actividades, entre as quais:

a) acção quimioatractiva sobre as células polimorfonucleadas e os macrófagos (1,2),

b) aumento da actividade citotóxica das células citotóxicas espontâneas ("natural killer" ou NK),

c) indução de febre a seguir a uma infecção,

d) principalmente a activação das células T para a produção de outros factores.

Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 5 (IL-5):

São produzidas por linfócitos T activados. A acção destas citóquinas está restringida às células do sistema imunitário, provocando a sua multiplicação e a sua activação: IL-2 e IL-4 foram ensaiadas em imunoterapia antitumoral no ratinho e no homem. No ratinho, agem de forma sinérgica e provocam a regressão tumoral.

Interleucina 6 (IL-6):

É produzida por numerosos tipos celulares de entre os quais os linfócitos T, os macrófagos, os fibroblastos, ... Induz a diferenciação final dos linfócitos B que se tornam produtores de anticorpos.

"Tumor Necrosis Factor-α" (TNF-α) (factor-α de necrose dos tumores):

É um factor produzido pelos macrófagos. Tem uma acção dupla: uma acção directa sobre as células tumorais provocando a sua lise e uma activação do sistema imunitário.

A utilização do TNF-α no homem deve fazer-se com precaução dado que numerosas células possuem o receptor: daí o interesse de não introduzir a sua secreção senão localmente, no seio do próprio tumor, para limitar os efeitos não desejáveis sobre as outras células do hospedeiro.

Interleucina 3 (IL-3), Interleucina 7 (IL-7) e "Colony Stimulating Factor" (CSF).

São factores de crescimento hematopoiético. São essencialmente produzidas pelos linfócitos, monócitos e macrófagos. Agem a diferentes níveis da hematopoiese, isto é, diferentes etapas de diferenciação de células da medula em células sanguíneas. Além disso o CSF tem efeitos muito importantes ao nível das defesas primárias do organismo face às defesas bacterianas, atraindo os macrófagos para os locais da infecção e aumentando a sua capacidade de fagocitose.

Em combinação com IL-2 e IL-4, o GM-CSF prova ser um importante factor antitumoral.

Interferão γ (IFN γ)

É um factor produzido pelas células T activadas; é dotado de propriedades anti-virais; inibe a multiplicação dos vírus e dos parasitas e provoca a lise das células infectadas e de certas células tumorais.

Interferão α (IFN α)

Produzido por células T e por monócitos, apresenta um efeito anti-viral e lítico sobre células infectadas. O IFN α foi utilizado em imunoterapia contra certos tipos de cancro entre os quais o mesotélio.

Entenda-se que quanto à escolha das sequências de inserção utilizáveis nos adenovírus de acordo com o invento, o invento não está limitado àquelas que foram acima identificadas. Apesar disso, estas são ilustrativas da diversidade de possibilidades que se oferecem ao terapeuta, a quem pertence a

escolha do adenovírus recombinante defectivo mais apropriado para ser utilizado, tendo em conta a natureza dos tumores.

O invento abrange igualmente a utilização de um adenovírus defectivo para a replicação que contém uma inserção contendo uma sequência nucleica codificando pelo menos uma citóquina, estando esta inserção sob o controlo de um promotor presente ou previamente inserido no genoma do citado adenovírus, em associação com um veículo farmaceuticamente aceitável para a preparação de medicamentos antitumorais. Estas composições farmacêuticas compreendem um ou vários vectores recombinantes como os acima descritos, em associação com um veículo farmaceuticamente aceitável, em particular para composições injectáveis directamente nos tumores a tratar, estéreis, isotónicas, ou composições secas, designadamente liofilizadas que, por adição, conforme o caso, de água esterilizada ou de soro fisiológico, permitem a constituição ou reconstituição de soluções injectáveis directamente nos tumores.

A injecção directa no tumor de adenovírus modificados, não replicáveis, oferece a vantagem de, por um lado, evitar a difusão dos adenovírus recombinantes na circulação geral, por consequência, com os efeitos secundários susceptíveis de serem exercidos pelas citóquinas expressas sem ser sobre os locais onde a manifestação da sua acção é procurada, neste caso as próprias células tumorais, ou células, designadamente linfócitos, que os infiltram ou que se encontram na sua proximidade imediata. De preferência, a injecção é pelo menos realizada em pelo menos um local do tumor primário.

O invento não está mais limitado à administração dos adenovírus recombinantes contendo as sequências codificantes para as citóquinas do género em questão directamente nos tumores. Pode ser considerada qualquer outra via de administração que permita o acesso destes adenovírus recombinantes ao tumor a tratar. Em particular, pode recorrer-se a células compatíveis com o hospedeiro, por exemplo, fibroblastos humanos, de preferência previamente recolhidos do próprio hospedeiro.

São igualmente descritas culturas celulares, por exemplo, fibroblastos em cultura antecipadamente infectados por ácidos nucleicos recombinantes, mais particularmente os adenovírus defectivos acima definidos. Estas células infectadas, se for caso disso, atenuadas ou tornadas imunologicamente inertes,

por exemplo, por irradiação, contribuem para a erradicação de tumores instalados aquando da sua injecção pela via geral. Esta injecção pode ser encarada quer sozinha quer além da injecção directa no tumor.

Um processo de obtenção de adenovírus recombinantes acima descritos compreende, após a fase de construção propriamente dita de um vector por introdução de um ou vários ácidos nucleicos de inserção no genoma do adenovírus defectivo inicial, uma etapa de transformação de linhas celulares transformáveis de eucariotas superiores (designadamente de origem humana ou animal) comportando em si próprias uma sequência distinta de nucleótidos, apta a complementar a parte ou as partes que faltam no genoma do adenovírus defectivo e sem as quais a replicação deste último está interdita, estando a citada sequência distinta de preferência incorporada no genoma das células da citada linha celular.

A título de exemplo preferido destas linhas celulares cita-se a linha 293, linha de rim embrionário humano que contém, integrados no seu genoma, os primeiros onze porcento da extremidade esquerda do genoma de um adenovírus do tipo 5 (Ad5). Estes podem então complementar vírus recombinantes defectivos que têm deleções desta região. Este processo de obtenção está mais particularmente descrito no pedido de patente europeia nº 0 185 573 de 20/11/85.

Após transformação destas linhas celulares, os adenovírus defectivos assim multiplicados e produzidos são recuperados a partir do meio de cultura das células destas linhas e purificados.

O presente invento será ainda mais detalhado na descrição que se segue das possibilidades de construção de um adenovírus vector recombinante contendo pelo menos uma sequência codificante para uma citóquina, em particular uma linfóquina.

## I. MÉTODOS

### a) Células e vírus

A linha celular 293 renal embrionária humana transformada por Ad5 (Graham et al., 1977), foi utilizada para a transfecção do ADN assim como a

multiplicação e a titulação do Adenovírus (Ad). Com efeito, a linha celular 293 complementa as funções dos genes de funções E1A e E1B e permitem a replicação dos Ad-recombinantes defectivos. Para a construção do Ad recombinante, foi utilizado (Shenk e Williams, 1984) o Ad5-dl324 humano, possuindo deleções nas regiões E1 (3.9-10.5 m.u.) e E3 (78.5-84.3 m.u.). As linhas celulares 293, Hela e Vero, foram mantidas num meio de cultura mínimo essencial de Eagle com 10% de soro de vitela fetal.

b) Construção dos plasmídeos que permitem a expressão de diferentes citóquinas

Foi descrito o vector de expressão eucariota pMLP10 (Ballay et al., 1985). Um derivado deste vector (pMLP18) foi construído por inserção de uma sequência contendo diferentes locais únicos de restrição a jusante do promotor principal tardio de adenovírus. Estes locais permitem assim a clonagem dos diferentes genes codificantes para as citóquinas escolhidas sob o controlo do promotor viral. A jusante desta sequência contendo estes locais únicos de restrição, foi colocada a sequência que contém o sinal de poliadenilação do gene codificante para os antigénios precoces do vírus SV40. O fragmento *Bg*III-*Hind*III de Ad5 é clonado a jusante. Esta sequência de 3 kpb contém o gene codificante para a proteína IX que é necessária para a encapsidação do genoma viral acima de 97% do seu tamanho normal e permite a ulterior recombinação *in vivo*. As sequências codificantes para os genes das diferentes citóquinas, são isoladas a partir de plasmídeos obtidos de diferentes equipas. Estas sequências obtidas após clivagem por meio de diferentes enzimas de restrição, são introduzidas no local de clonagem múltipla do vector de expressão descrito acima (pMLP-18). Obtêm-se assim os diferentes plasmídeos denominados pMLP-citóquina (IL-2, IL-4, etc...) que são utilizados para a obtenção de vírus recombinantes conforme descrito no parágrafo seguinte.

c) Transfecção de ADN e isolamento de vírus recombinantes

Os adenovírus recombinantes defectivos Ad-citóquinas foram obtidos por recombinação *in vivo* entre o fragmento direito do genoma viral clivado anteriormente pela enzima de restrição *Cla*I e a sequência homóloga existente nos plasmídeos pMLP-citóquina acima descritos. A mistura do fragmento do genoma viral (2,6 m.u. - 100 m.u.), purificado após clivagem, e do plasmídeo linearizado pela enzima de restrição *Cla*I ou *Pvu*I é transfectada nas células 293, utilizando o método de precipitação com fosfato de cálcio (Graham e Van Der

Eb, 1973). As placas fágicas de células que apresentam um efeito citopático foram isoladas após 10 dias e o vírus foi amplificado em cultura. O ADN viral foi extraído pelo processo Hirt (Graham et al., 1977) e os vírus recombinantes foram identificados por mapeamento com enzimas de restrição.

A figura 1 representa esquematicamente uma construção deste tipo, utilizando uma sequência de inserção codificando para uma interleucina (IL-2, IL-4, etc...).

Nesta figura:

- "leaders" corresponde a um comendo tripartido
- "del" corresponde a uma "deleção"
- Ad dl 324 corresponde a um adenovírus provido das "deleções" acima indicadas.

d) Expressão das sequências codificantes para uma citóquina expressa

As linhas celulares Hela ou Vero são infectadas com os vírus recombinantes defectivos obtidos. As células efectivamente transfectadas podem ser caracterizadas essencialmente graças à detecção da actividade da citóquina libertada no seu meio de cultura. No caso de IL-II, foram observados rendimentos que podem atingir de 1 a 2 μg de interleucina por $10^6$ de células.

As células infectadas por um recombinante Ad-citóquina segregam no meio de cultura quantidades variáveis da citóquina. Existem diferentes métodos para a detecção e a quantificação das citóquinas produzidas.

1) Métodos Quantitativos:
- ELISA, utilizando anticorpos específicos
- RIA (radioimunoensaio)
- Western Blot

2) Métodos qualitativos (ou bioensaios): baseados nas propriedades biológicas das citóquinas

Por exemplo:

IL-2: Ensaio de proliferação das células CTL-L2 (as células CTL-L2 não se multiplicam e não se mantêm em cultura senão em presença de IL-2 no meio de cultura)

IL-3 e GM-CSF: Ensaio de proliferação das células TF-1

IL-4: Ensaio de proliferação das células CTL-L2 e indução de CD23 solúveis, por certas células como os linfócitos.

INF-α: Ensaio de citotoxicidade sobre as células L92-9.

Ensaio de neutralização: O efeito das citóquinas pode ser bloqueado incubando as células alvo em presença de células de anticorpos específicos.

Expõem-se em seguida alguns resultados obtidos com o vector adenovírus portador do gene de IL-2(Ad-IL-2).

1) As células infectadas *in vitro* com Ad-IL-2 segregam quantidades significativas de IL-2 funcional.

2) A injecção directa do vector portador do gene de IL-2 nos tumores já estabelecidos no animal (o diâmetro tumoral no momento da injecção está entre 4 e 7 mm) induz o estímulo dos sistemas imunitários que se traduz pela estabilização do tamanho do tumor, seguida da sua regressão até ao desaparecimento completo em 40% a 50% dos casos.

Este resultado pode ser melhorado tratando os tumores numa fase mais precoce do seu desenvolvimento ou utilizando diferentes vectores ao mesmo tempo, por exemplo, a associação de Ad-IL-2 com Ad-INF e/ou Ad-IL-4, Ad-GM-CSF, Ad-IL-3. Esta combinação será determinada conforme o tipo de tumor.

3) As células tumorais infectadas *in vitro,* depois de injectadas a animais singénicos ou mesmo a animais imunodeficientes (ratinho Nu-Nu) perdem o seu poder tumorígeno (pelo menos até 80% dos animais rejeitam as células tumorais); por outras palavras, as células tumorais deixam de proliferar em 80% dos animais imunodeficientes injectados com estas células.

4) Os animais que rejeitaram uma primeira injecção de células tumorais infectadas estão altamente imunizados e protegidos contra células tumorais

parentais (não infectadas) e injectadas em tempos diferentes e em locais diferentes.

Co-injectadas com células tumorais infectadas *in vitro*, as células esplénicas destes animais imunizados são também capazes de transferir a imunidade antitumoral para animais receptores.

É evidente que as descrições das construções de adenovírus defectivos recombinantes acima concretizados não têm nenhum carácter restritivo. Podem ser efectuadas outras construções, designadamente segundo as variantes ainda indicadas a seguir a título de exemplo.

1) Troca de promotores

O promotor principal tardio do Adenovírus pode ser substituído por outros promotores ubiquitários mas de origem exógena como:

- promotor contido no LTR (Long Terminal Repeat) de RSV (Rous Sarcome Vírus)
- o promotor do gene IE de CMV (citomegalovírus)
- os promotores indutíveis MMTV (Mouse Mammary Tumor Vírus) ou metalotionina.

Também podem ser utilizados promotores que permitem uma expressão mais específica, restringida às células tumorais, como por exemplo:

- o promotor do gene rep do parvovírus HI.

O invento refere-se ainda a um ácido nucleico recombinante do tipo acima indicado caracterizado por a sequência genómica do adenovírus estar desprovida da sua região da extremidade 5', a jusante do promotor precoce da região E1A do adenovírus e por a sequência codificante para a citóquina estar colocada sob o controlo deste promotor precoce. Este ácido nucleico recombinante pode igualmente ser utilizado nas aplicações mais particularmente mencionadas em relação aos ADN recombinantes nos quais a sequência codificante para a citóquina está colocada sob o controlo do promotor principal tardio do adenovírus.

2) Expressão simultânea de vários genes de citóquinas

Descrevem-se 3 tipos de construções:

- os genes de citóquinas estão sob o controlo de dois promotores idênticos ou diferentes (MLP e RSV, por exemplo) e situados um a seguir ao outro.
- os genes das citóquinas estão sob o controlo de promotores distintos e clonados em regiões distintas do vírus.

Lisboa, 18 DEZ. 2001

Por CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE e
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

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

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um adenovírus defectivo para a replicação, que contém uma inserção contendo uma sequência nucleica codificante para pelo menos uma citóquina, estando esta inserção sob o controlo de um promotor presente ou antecipadamente inserido no genoma do citado adenovírus, em associação com um veículo farmaceuticamente aceitável, para a preparação de medicamentos antitumorais.

2. Utilização segundo a reivindicação 1, caracterizada por o citado adenovírus defectivo para a replicação estar desprovido das regiões E1A e E1B e, facultativamente, da região E3.

3. Utilização segundo as reivindicações 1 ou 2, caracterizada por a citada sequência nucleica codificante para uma citóquina estar colocada sob o controlo de um promotor precoce da região E1A.

4. Utilização segundo as reivindicações 1 ou 2, caracterizada por a citada sequência nucleica codificante para uma citóquina estar colocada sob o controlo de um promotor tardio do adenovírus.

5. Utilização segundo as reivindicações 1 ou 2, caracterizada por a citada sequência nucleica codificante para uma citóquina estar colocada sob o controlo de um promotor estranho ao genoma do adenovírus.

6. Utilização segundo a reivindicação 5, caracterizada por o citado promotor estranho ser seleccionado entre o grupo que consiste no promotor contido no LTR de RSV, no promotor do gene IE de CMV, nos promotores indutíveis MMTV ou metalotionina ou no promotor do gene rep do parvovírus HI.

7. Utilização segundo uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada por a citada citóquina ser seleccionada entre o grupo que consiste em IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, interferão alfa, interferão gama, TNF alfa, CSF e o GM-CSF.

8. Utilização de um adenovírus defectivo para a replicação que contém pelo menos uma inserção contendo uma sequência nucleica codificante para pelo menos uma citóquina, estando esta inserção sob o controlo de um promotor presente ou antecipadamente inserido no genoma do citado adenovírus para a preparação de medicamentos antitumorais.

9. Utilização segundo a reivindicação 8, caracterizada por o citado adenovírus defectivo para a replicação estar desprovido das regiões E1A e E1B e, facultativamente, da região E3.

10. Utilização segundo as reivindicações 8 ou 9, caracterizada por a citada sequência nucleica codificante para uma citóquina estar colocada sob o controlo de um promotor precoce da região E1A.

11. Utilização segundo as reivindicações 8 ou 9, caracterizada por a citada sequência nucleica codificante para uma citóquina estar colocada sob o controlo de um promotor tardio do adenovírus.

12. Utilização segundo as reivindicações 8 ou 9, caracterizada por a citada sequência nucleica codificante para uma citóquina estar colocada sob o controlo de um promotor estranho ao genoma do adenovírus.

13. Utilização segundo a reivindicação 12, caracterizada por o citado promotor estranho ser seleccionado entre o grupo constituído pelo promotor contido no LTR de RSV, o promotor do gene IE de CMV, os promotores indutíveis MMTV ou metalotionina ou o promotor do gene rep do parvovírus HI.

14. Utilização segundo uma das reivindicações 8 a 13, caracterizada por a citada citóquina ser seleccionada entre o grupo constituído por IL-1, Il-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, interferão alfa, interferão gama, TNF alfa, CSF e o GM-CSF.

15. Utilização segundo qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizada por os citados medicamentos antitumorais serem directamente injectáveis no tumor do hospedeiro.

16. Utilização segundo qualquer uma das reivindicações 5 ou 12, caracterizada por o citado promotor ser um promotor reconhecido pelas polimerases de células tumorais humanas ou de células que infiltram os tumores.

17. Utilização segundo a reivindicação 16, caracterizada por as citadas células que infiltram os tumores serem linfócitos.

18. Utilização segundo uma das reivindicações 1 a 6 ou 8 a 13, caracterizada por a citada citóquina ser um activador de células imunocompetentes do organismo.

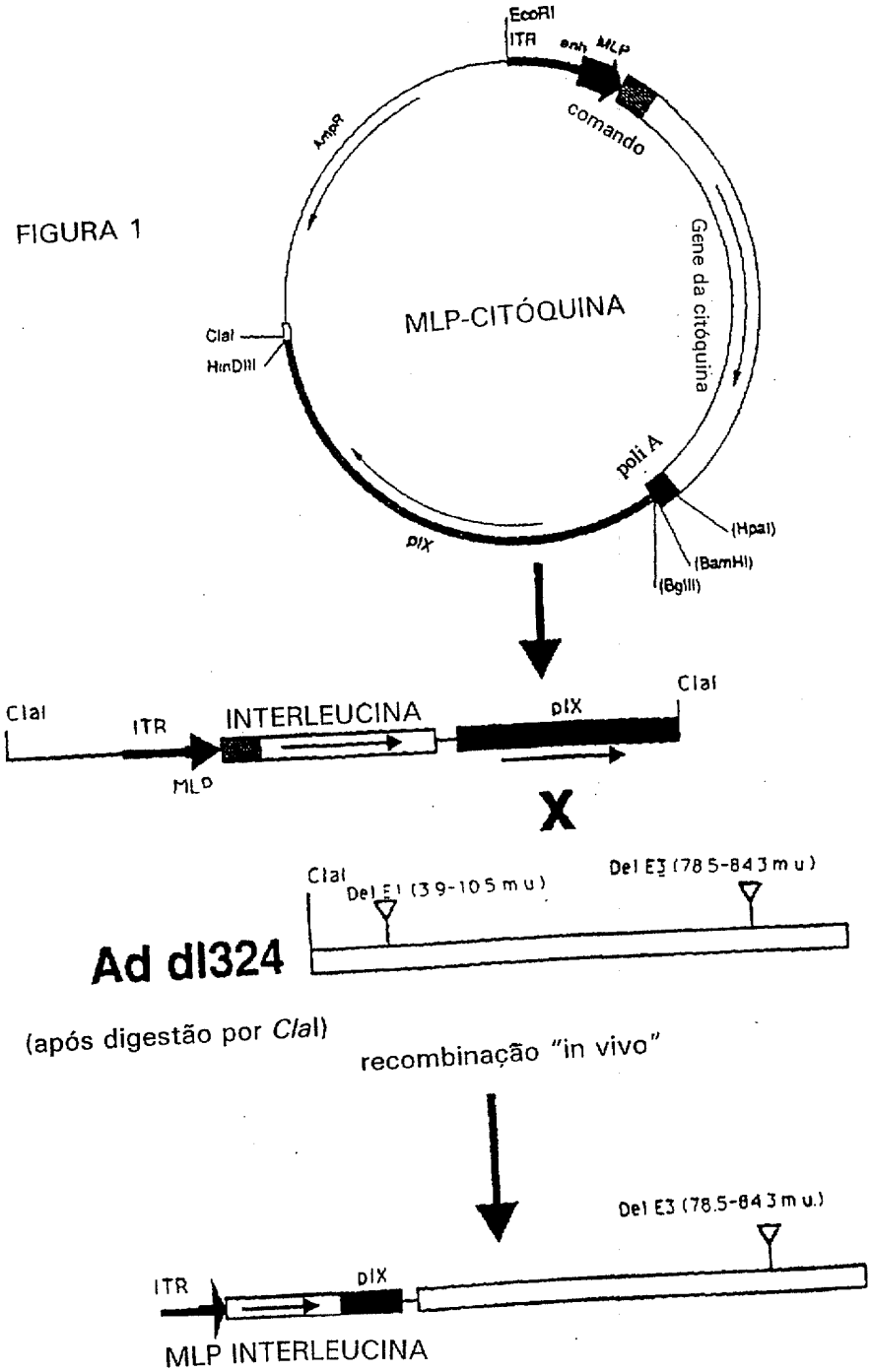
19. Utilização segundo uma das reivindicações 1 a 18, caracterizada por o citado adenovírus defectivo para a replicação ser um adenovírus humano de tipo 2 ou 5.

Lisboa, 18. DEZ. 2001

Por CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE e
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY
- 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

FIGURA 1


EcoRI
ITR
enh
MLP
comando
AmpR
Gene da citóquina
MLP-CITÓQUINA
ClaI
HinDIII
poli A
pIX
(HpaI)
(BamHI)
(BglII)
ClaI
ITR
INTERLEUCINA
pIX
ClaI
MLP
X
ClaI
Del E1 (339-1055 mu)
Del E3 (7855-8433 mu)
Ad dl324
(após digestão por ClaI)
recombinação "in vivo"
Del E3 (78.5-84.3 m u.)
ITR
pIX
MLP INTERLEUCINA