

(11) Número de Publicação: PT 783585 E

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/005 (2006.01) C07K 14/075 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1995.09.22

(30) Prioridade(s): 1994.09.27 FR 9411511

(43) Data de publicação do pedido: 1997.07.16

(45) Data e BPI da concessão: 2006.06.28
011/2006

(73) Titular(es):

AVENTIS PHARMA, S.A.

20 AVENUE RAYMOND ARON 92160 ANTONY

FR

(72) Inventor(es):

MICHEL PERRICAUDET

FR

EMMANUELLE VIGNE

FR

PATRICE YEH

FR

CÉCILE ORSINI

FR

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA

RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA

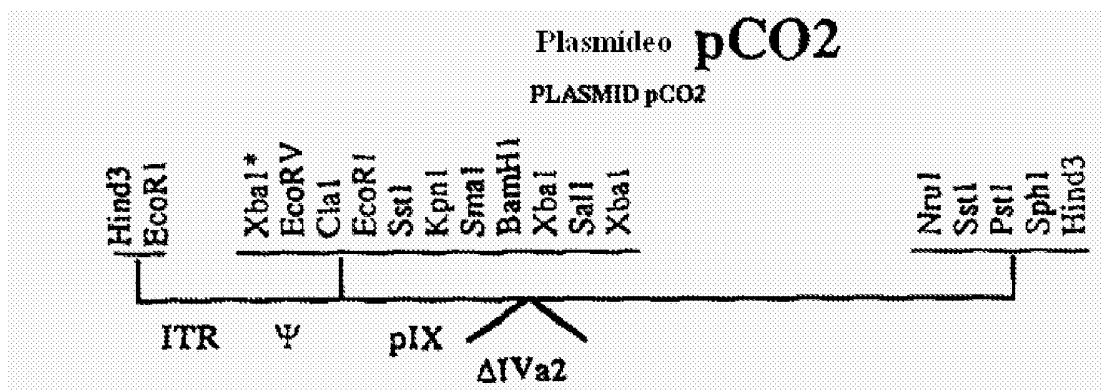
PT

(54) Epígrafe: ADENOVIRUS RECOMBINANTES DEFECTIVOS COM UM GENE IVA2 INATIVADO

(57) Resumo:

RESUMO

"ADENOVIRUS RECOMBINANTES DEFECTIVOS COM UM GENE IVa2 INATIVADO"



A presente invenção refere-se a novos vectores virais derivados de adenovirus, à sua preparação e à sua utilização em terapia com genes. Refere-se, em particular, a adenovirus recombinantes defectivos, nos quais o gene IVa2 pelo menos está inactivado.

DESCRIÇÃO

"ADENOVIRUS RECOMBINANTES DEFECTIVOS COM UM GENE IVa2 INACTIVADO"

A presente invenção refere-se a novos vectores virais, à sua preparação e à sua utilização em terapia com genes. Refere-se igualmente às composições farmacêuticas que contêm os referidos vectores virais. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a adenovirus recombinantes como vectores para a terapia com genes.

A terapia com genes consiste em corrigir uma deficiência ou uma anomalia (mutação, expressão aberrante, etc.) por introdução de uma informação genética na célula ou no órgão afectado. Esta informação genética pode ser introduzida ou *in vitro* numa célula extraída do órgão, sendo então a célula modificada reintroduzida no organismo, ou directamente *in vivo* no tecido apropriado. No segundo caso, existem diferentes técnicas, entre as quais técnicas diversas de transfecção implicando complexos de ADN e de Δ EAE-dextrano (Pagano *et al.*, J. Virol. 1 (1967) 891), de ADN e de proteínas nucleares (Kaneda *et al.*, Science 243 (1989) 375), de ADN e de lípidos (Felgner *et al.*, PNAS 84 (1987) 7413), o emprego de liposomas (Fraleigh *et al.*, J. Biol. Chem. 255 (1980) 10431), etc. Mais recentemente, o emprego de vírus como vectores para a transferência de genes apareceu como uma alternativa promissora às técnicas físicas de transfecção. Para este efeito, foram testados diferentes vírus quanto à sua capacidade de infectar certas populações celulares, em particular, os retrovírus (RSV, HMS, etc.), o vírus HSV, os vírus adeno-associados, e os adenovirus.

Entre estes vírus, os adenovirus apresentam certas propriedades interessantes para uma utilização em terapia

com genes. Nomeadamente, eles têm um espectro de hospedeiro bastante grande, são capazes de infectar células quiescentes, não se integram no genoma da célula infectada, e não foram associados, até ao presente, a patologias importantes no homem. Os adenovirus são vírus com ADN de espiral dupla linear, com um tamanho de cerca 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 adenovirus mencionadas acima, estes foram já utilizados para a transferência de genes *in vivo*. Para este efeito, foram preparados diferentes vectores derivados dos adenovirus, incorporando diferentes genes (β -gal, OTC, a-IAT, citoquinas, etc.). Em cada uma destas construções, o adenovirus foi modificado de modo a torná-lo incapaz de replicação na célula infectada. Assim, as construções descritas na técnica anterior são adenovirus deletados das regiões E1 (E1a e/ou E1b) e eventualmente E3, ao nível das quais são inseridas as sequências de ADN heterólogo (Levrero *et al.*, Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury *et al.*, Gene 50 (1986) 161). Todavia, os vectores descritos na técnica anterior apresentam numerosos inconvenientes que limitam a sua exploração em terapia com genes. Em particular, todos estes vectores compreendem numerosos genes virais, cuja expressão *in vivo* não é desejável no âmbito de uma terapia com genes. Além disso, estes vectores não permitem a incorporação de fragmentos de ADN de grande tamanho, que podem ser necessários para certas aplicações.

A presente invenção permite solucionar estes inconvenientes. A presente invenção descreve, com efeito,

novos adenovirus recombinantes utilizáveis em terapia com genes, nomeadamente para a transferência e a expressão de genes *in vivo*. Em particular, os adenovirus da invenção permitem uma transferência eficaz e uma expressão durável *in vivo* de um gene com interesse, limitando ao mesmo tempo os riscos de produção de proteínas virais, de transmissão de vírus, de patogenicidade, etc.

A presente invenção reside mais particularmente na construção de adenovirus recombinantes, nos quais pelo menos um gene viral particular, designado por IVa2, foi tornado não funcional. O gene IVa2 é um pequeno gene situado na parte esquerda do genoma do adenovirus. Ele sobrepõe-se em parte com a extremidade do gene E2B nomeadamente, o que torna delicada a sua manipulação. O gene IVa2 parece ter um papel de activador da transcrição dos genes tardios no ciclo replicativo do adenovirus. A sua presença permite, ou favorece, portanto, a expressão das proteínas do vírus, necessárias à formação das partículas virais.

A requerente mostrou agora que é possível inactivar este gene no genoma do adenovirus. A requerente mostrou, por outro lado, que esta inactivação não afectava as propriedades do adenovirus como vector de terapia com genes, designadamente o seu alto poder de infecção das células, nomeadamente humanas, e a sua capacidade para transferir eficazmente um gene de interesse para as referidas células. Além disso, em relação aos vectores da técnica anterior, os vectores descritos na presente invenção possuem uma capacidade de incorporação de genes de interesse melhorada, resultante da inactivação por eliminação do gene IVa2; e, sobretudo, são nitidamente menos imunogéneos, visto que a expressão dos genes tardios eventualmente presentes nos adenovirus recombinantes de

acordo com a invenção é consideravelmente diminuída, ou mesmo abolida.

Os vectores da invenção são, portanto, particularmente vantajosos, visto que permitem a incorporação de genes de interesse de grande dimensão (superior a 8 kb e podendo atingir mais de 11 kb) sem afectar particularmente os títulos obtidos, e que possuem muito poucas regiões virais expressas, o que reduz acentuadamente, ou suprime mesmo, os riscos inerentes à utilização de vírus como vectores em terapia com genes, tais como a imunogenicidade, a patogenicidade, a transmissão, a replicação, a recombinação, etc. A presente invenção fornece assim vectores virais particularmente adaptados à transferência e à expressão *in vivo* de sequências de ADN desejadas.

Um primeiro objectivo da presente invenção refere-se, portanto, a um adenovirus recombinante defectivo no qual o gene IVa2 pelo menos está inactivado.

Os adenovirus são chamados defectivos quando são incapazes de se replicar de maneira autónoma nas células infectadas. Geralmente, o genoma dos adenovirus de acordo com a presente invenção é, portanto, desprovido pelo menos das sequências necessárias à replicação do referido vírus na célula infectada. Estas regiões podem ser ou eliminadas (no todo ou em parte), ou tornadas não-funcionais, ou substituídas por outras sequências e, nomeadamente, por uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga.

Como foi indicado antes, a requerente mostrou agora que é possível inactivar o gene IVa2 no genoma do adenovirus, sem afectar as propriedades desejadas deste vírus. Mais particularmente, para a preparação dos vectores da invenção, o gene IVa2 pode ser inactivado por diferentes técnicas conhecidas dos peritos na técnica, e, nomeadamente, por supressão, substituição, eliminação e/ou adição de uma ou várias bases. Tais modificações podem ser

obtidas *in vitro* (no ADN isolado) ou *in situ*, por exemplo, por meio das técnicas de engenharia genética, ou ainda por tratamento por meio de agentes mutagénicos. A ou as referidas modificações genéticas podem ser localizadas na parte codificante do gene, ou fora da região codificante, e, por exemplo, nas regiões responsáveis pela expressão e/ou pela regulação transcricional dos referidos genes. A inactivação do gene pode, portanto, manifestar-se pela produção de uma proteína inactiva em virtude de modificações estruturais ou conformacionais, pela ausência de produção, pela produção de uma proteína que tem uma actividade alterada, ou ainda pela produção da proteína natural a um nível atenuado ou de acordo com um modo de regulação desejado.

Entre os agentes mutagénicos utilizáveis para a inactivação, podem citar-se, por exemplo, os agentes físicos, tais como os raios energéticos (raios X, γ , ultra-violeta, etc.), ou os agentes químicos capazes de reagir com diferentes grupos funcionais das bases do ADN, e, por exemplo, os agentes alquilantes [(etilmetanosulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, N-nitroquinoleína-1-óxido (NQO)], os agentes bialquilantes, os agentes intercalantes, etc.

As modificações genéticas podem igualmente ser obtidas por disrupção de genes, por exemplo, de acordo com o protocolo inicialmente descrito por Rothstein [Meth. Enzymol. 101 (1983) 202]. Neste caso, toda ou parte da sequência codificante é preferencialmente perturbada para permitir a substituição, por recombinação homóloga, da sequência genómica por uma sequência não funcional ou mutante.

Preferencialmente, nos adenovirus da invenção, o gene IVa2 é inactivado por mutação e/ou eliminação de uma ou

várias bases. Ainda mais preferencialmente, o gene IVa2 é inativado por deleção total ou parcial.

Mais particularmente, entende-se por deleção qualquer supressão de todo ou parte do gene considerado. Pode tratar-se nomeadamente de toda ou parte da região codificante do referido gene, e/ou de toda ou parte da região promotora da transcrição do referido gene. A supressão pode ser efectuada por digestão por meio de enzimas de restrição apropriados, depois laquação, de acordo com as técnicas clássicas da biologia molecular, tal como é ilustrado nos exemplos.

De maneira particularmente preferida, a inactivação dos genes é realizada de tal maneira que só afecte o gene considerado e não os outros genes virais, nomeadamente genes próximos. Por outro lado, sendo, por natureza, certas alterações, tais como mutações pontuais, capazes de ser corrigidas ou atenuadas por mecanismos celulares, é particularmente preferido que a inactivação seja perfeitamente estável segregacionalmente e/ou não reversível.

De acordo com um modo particularmente vantajoso, nos adenovirus recombinantes da presente invenção, o gene IVa2 é inativado por eliminação de um fragmento BssHII-BstEII, que se estende do nucleótido 4106 ao nucleótido 5186, na sequência do adenovirus Ad5. Esta sequência é acessível na literatura e igualmente em bases de dados (ver nomeadamente Genebank nº M73260).

Os adenovirus recombinantes de acordo com a invenção compreendem, vantajosamente, as sequências ITR e uma região que permite a encapsidação.

As sequências invertidas repetidas (ITR) constituem a origem de replicação dos adenovirus. Estão localizadas nas extremidade 3' e 5' do genoma viral (ver figura 1), de onde podem ser isoladas facilmente de acordo com as técnicas

clássicas da biologia molecular conhecidas dos peritos na técnica. A sequência nucleotídica das sequências ITR dos adenovirus humanos (em particular dos serotipos Ad2 e Ad5) está descrita na literatura, assim como dos adenovirus caninos (nomeadamente CAV1 e CAV2). Com referência ao adenovirus 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 genoma viral. Esta região deve, portanto, estar presente para permitir a preparação de adenovirus recombinantes defectivos de acordo com a invenção. A sequência de encapsidação está localizada no genoma dos adenovirus, entre o ITR esquerdo (5') e o gene E1 (ver figura 1). Pode ser isolada ou sintetizada artificialmente por técnicas clássicas da biologia molecular. A sequência nucleotídica da sequência de encapsidação dos adenovirus humanos (em particular dos serotipos Ad2 e Ad5) está descrita na literatura, assim como dos adenovirus caninos (nomeadamente CAV1 e CAV2). No que se refere ao adenovirus Ad5, por exemplo, uma sequência de encapsidação funcional está compreendida entre os nucleótidos 194 e 358 do genoma.

Num primeiro modo particular de realização, os adenovirus recombinantes da invenção contêm uma deleção de todos ou parte dos genes E1 e IVa2.

Noutro modo particular de realização, os adenovirus recombinantes da invenção contêm uma deleção de todos ou parte dos genes E4 e IVa2.

Sempre de acordo com um modo preferido de realização, os adenovirus recombinantes da invenção contêm uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2 e E3.

Numa variante particularmente vantajosa, os adenovirus recombinantes da invenção contêm uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2 e E4.

Os adenovirus recombinantes de acordo com a invenção, possuindo propriedades particularmente atractivas para uma utilização em terapia com genes, são aqueles que contêm uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2, E3, E4 e eventualmente L5. Estes vectores combinam, com efeito, propriedades de infecção, de segurança e de capacidade de transferência de genes muito elevadas.

Vantajosamente, os adenovirus recombinantes da invenção compreendem, além disso, uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga, cuja transferência e/ou a expressão numa célula, um órgão ou um organismo é desejada.

Em particular, a sequência de ADN heteróloga pode conter um ou vários genes terapêuticos e/ou um ou vários genes que codificam para peptídeos antigénicos.

Os genes terapêuticos que podem assim ser transferidos são todos os genes cuja transcrição e eventualmente a tradução na célula alvo geram produtos tendo um efeito terapêutico.

Pode tratar-se, em particular, de genes que codificam para produtos proteicos que têm um efeito terapêutico. O produto proteico assim codificado pode ser uma proteína, um peptídeo, um ácido aminado, etc. Este produto proteico pode ser homólogo face à célula alvo (quer dizer, um produto que é normalmente expresso na célula alvo quando esta não apresenta nenhuma patologia). Neste caso, a expressão de uma proteína permite, por exemplo, minorar uma expressão insuficiente na célula ou a expressão de uma proteína inactiva ou fracamente activa em virtude de uma modificação, ou ainda sobreexpressar a referida proteína. O gene terapêutico pode assim codificar para um mutante de uma proteína celular, tendo 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 acrescentar uma actividade deficiente na célula, permitindo-lhe lutar contra uma patologia.

Entre os produtos terapêuticos no sentido da presente invenção, podem citar-se mais particularmente os enzimas, os derivados sanguíneos, as hormonas, as linfoquinas: interleuquinas, interferões, TNF, etc. (FR 9203120), os factores de crescimento, os neurotransmissores ou os seus precursores, ou enzimas de síntese, os factores tróficos: BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc.; as apolipoproteínas: ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc. (FR 9305125), a distrofina ou uma minidistrofina (FR 9111947), 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, etc., os genes suicidas: timidina cinase, citosina desaminase, etc.

O gene terapêutico pode igualmente ser um gene ou uma sequência de sentido inverso, 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, de acordo com a técnica descrita na patente EP 140 308.

Como foi indicado mais acima, a sequência de ADN heterólogo pode igualmente compreender um ou vários genes que codificam para um peptídeo antigénico, capaz de gerar no homem uma resposta imunitária. Neste modo particular de realização, a invenção permite, portanto, a realização de vacinas permitindo imunizar o homem, nomeadamente contra os microorganismos ou os vírus. Pode tratar-se, nomeadamente, de peptídeos antigénicos específicos do vírus de "epstein barr", do vírus HIV, do vírus da hepatite B (EP 185 573),

do vírus da pseudo-raiva, ou ainda específico de tumores (EP 259 912).

Geralmente, a sequência de ácidos nucleicos heteróloga compreende igualmente uma região promotora da transcrição funcional na célula infectada. Pode tratar-se de uma região promotora naturalmente responsável pela expressão do gene considerado quando este é susceptível de funcionar na célula infectada. Pode igualmente tratar-se de regiões de origem diferente (responsáveis pela expressão de outras proteínas, ou mesmo sintéticas). Nomeadamente, pode tratar-se de sequências promotoras de genes eucariotes ou virais. Por exemplo, pode tratar-se de sequências promotoras derivadas do genoma da célula que se deseja infectar. Da mesma maneira, pode tratar-se de sequências promotoras derivadas do genoma de um vírus, compreendendo o adenovírus utilizado. A este respeito podem citar-se, por exemplo, os promotores dos genes ElA, MLP, CMV, RSV, etc. Além disso, estas regiões promotoras podem ser modificadas por adição de sequências de activação, de regulação, ou permitem uma expressão específica do tecido ou maioritária. Por outro lado, quando o ácido nucleico heterólogo não compreende sequências promotoras, pode ser inserido no genoma do vírus defectivo a jusante de uma tal sequência.

Por outro lado, a sequência de ácidos nucleicos heteróloga pode igualmente compreender, em particular a montante do gene terapêutico, uma sequência sinal dirigindo o produto terapêutico sintetizado para as vias de secreção da célula alvo. Esta sequência sinal pode ser a sequência sinal natural do produto terapêutico, mas pode igualmente tratar-se de qualquer outra sequência sinal funcional, ou de uma sequência sinal artificial.

Sempre num modo particularmente vantajoso, os vectores da invenção possuem, além disso, um gene E3 funcional sob o controle de um promotor heterólogo. Mais preferencialmente,

os vectores possuem uma parte do gene E3 permitindo a expressão da proteína gp 19K. Esta proteína permite, com efeito, evitar que o vector adenovirus seja o objecto de uma reacção imunitária que (i) limitaria a sua acção, e (ii) poderia ter efeitos secundários indesejáveis.

Os adenovirus recombinantes de acordo com a invenção podem ter origens diversas. Existem, com efeito, diferentes serotipos de adenovirus, cuja estrutura e as propriedades variam um pouco, mas que apresentam uma organização genética comparável. Por este facto, os ensinamentos descritos no presente pedido podem ser facilmente reproduzidos pelos peritos na técnica para qualquer tipo de adenovirus.

Mais particularmente, os adenovirus da invenção podem ter origem humana, animal, ou mista (humana e animal).

Com referência aos adenovirus de origem humana, prefere-se utilizar os que são classificados no grupo C. Mais preferencialmente, entre os diferentes serotipos de adenovirus humano, prefere-se utilizar, no âmbito da presente invenção, os adenovirus de tipo 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5).

Como foi indicado mais acima, os adenovirus da invenção podem igualmente ter origem animal, ou conter sequências derivadas de adenovirus de origem animal. A requerente mostrou, com efeito, que os adenovirus 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 9305954). A requerente mostrou igualmente que os adenovirus de origem animal não são de forma alguma transcomplementados pelos adenovirus de origem humana, o que elimina qualquer risco de recombinação e de propagação *in vivo*, na presença de um adenovirus humano, podendo conduzir à formação de uma partícula infecciosa. A

utilização de adenovirus ou regiões de adenovirus de origem animal é, portanto, particularmente vantajosa, porque os riscos inerentes à utilização de vírus como vectores em terapia com genes são ainda mais fracos.

Os adenovirus de origem animal utilizáveis no âmbito da presente invenção podem ter origem canina, bovina, murina, (exemplo: Mavl, Beard *et al.*, Virology 75 (1990) 81), ovina, porcina, aviária ou ainda siamesca (exemplo: SAV). Mais particularmente, entre os adenovirus aviários, podem citar-se os serotipos 1 a 10 acessíveis no 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 adenovirus bovinos, podem utilizar-se os diferentes serotipos conhecidos, e nomeadamente os disponíveis no ATCC (tipos 1 a 8) sob as referências ATCC VR-313, 314, 639-642, 768 e 769. Podem igualmente citar-se os adenovirus murinos FL (ATCC-550) e E20308 (ATCC VR-528), o adenovirus ovino tipo 5 (ATCC VR-1343), ou tipo 6 (ATCC VR-1340), o adenovirus porcino 5359), ou os adenovirus simiescos, tais como, nomeadamente, os adenovirus referenciados no ATCC sob os números VR-591-594, 941-943, 195-203, etc.

De preferência, entre os diferentes adenovirus de origem animal utiliza-se, no âmbito da invenção, adenovirus ou regiões de adenovirus de origem canina, e nomeadamente todas as estirpes dos adenovirus CAV2 [estirpe Manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800), por exemplo]. Os adenovirus caninos foram objecto de numerosos estudos estruturais. Assim, foram descritas cartas de restrição completas de adenovirus CAV1 e CAV2 na técnica anterior (Spilbey *et al.*, J. Gen. Virol 70 (1989) 165), e os genes Ela, E3, assim como as sequências ITR foram clonadas e sequenciadas (ver

nomeadamente Spilbey *et al.*, Vírus Res. 14 (1989) 241; Linné, Vírus Res. 23 (1992) 119, WO 91/11525).

Os adenovirus recombinantes defectivos de acordo com a invenção podem ser preparados de diferentes maneiras. Um primeiro método consiste em transfectar o ADN do vírus recombinante defectivo preparado *in vitro* (seja por ligação, seja sob a forma de plasmídeo) numa linhagem celular competente, quer dizer, contendo em trans todas as funções necessárias à complementação do vírus defectivo. Estas funções são preferencialmente integradas no genoma da célula, o que reduz os riscos de recombinação, e confere uma estabilidade acrescida à linhagem celular. A preparação de tais linhagens celulares está descrita nos exemplos.

Uma segunda abordagem consiste em co-transfectar numa linhagem celular apropriada o ADN do vírus recombinante defectivo preparado *in vitro* (seja por ligação, seja sob a forma de plasmídeo) e o ADN de um ou vários vírus ou plasmídeo helper. De acordo com este método, não é necessário dispor de uma linhagem celular competente capaz de complementar todas as funções defectivas do adenovirus recombinante. Uma parte destas funções é, com efeito, complementada pelo ou pelos vírus helper. Este ou estes vírus helper são eles próprios defectivos. A preparação de adenovirus recombinantes defectivos da invenção segundo este método está igualmente ilustrada nos exemplos.

A este respeito, o presente pedido descreve igualmente a construção de plasmídeos contendo a parte esquerda modificada do genoma do adenovirus Ad5 (plasmídeos pC01 e pC02). Estes plasmídeos são particularmente úteis para a construção de adenovirus recombinantes defectivos como vectores de terapia com genes. Assim, o plasmídeo pC01 contém a região esquerda do genoma do adenovirus, desde o ITR esquerdo até ao nucleótido 6316, com uma deleção da região compreendida entre os nucleótidos 382-3446,

correspondente ao gene E1. Este plasmídeo é particularmente vantajoso porque contém, em relação aos outros plasmídeos deste tipo descritos na técnica anterior, uma deleção maior ao nível do gene E1, oferecendo mais capacidades de clonagem e, sobretudo, menos riscos de recombinação. O plasmídeo pC02 deriva do plasmídeo pC01 por deleção de uma região suplementar compreendida entre os nucleótidos 4106-5186, e correspondente a uma parte do gene IVa2. Esta deleção tem a vantagem de não afectar o gene E2. O plasmídeo pC06 deriva do plasmídeo pC01 por inserção de um codão stop na fase de leitura do gene IVa2. Os plasmídeos pC01, pC02 e pC06 contêm, por outro lado, um "multissítio" de clonagem, permitindo a incorporação de uma sequência de ácidos nucleicos heteróloga de interesse. A construção resultante pode ser, em seguida, utilizada para preparar o adenovirus recombinante defectivo por cotransfecção com um ADN correspondente à parte direita do genoma do adenovirus, numa linhagem celular competente. No que se refere a este último, pode ser derivado do genoma de um vírus selvagem, ou de um vírus ele próprio defectivo, tal como Add11324, que é deletado da região E3: Add1808 que é deletado da região E4 (Weinberg et al., J. Virol. 57 (1986) 833), etc. (ver exemplos). Entre as linhagens celulares utilizáveis, pode citar-se, nomeadamente, a linhagem de rim embrionário humano 293, as células KB, as células Hela, MDCK, GHK, etc., e mais geralmente, qualquer linhagem celular complementando para a ou as regiões deletadas (ver exemplos).

Em seguida, os vírus recombinantes que se multiplicaram são recuperados, purificados e amplificados de acordo com as técnicas clássicas da virologia.

O plasmídeo pC01 permite assim a construção de adenovirus recombinantes defectivos contendo uma deleção ao

nível do gene E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446.

O plasmídeo pC02 permite a construção de adenovirus recombinantes defectivos contendo uma deleção ao nível do gene E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446, e uma deleção ao nível do gene IVa2, que se estende do nucleótido 4106 ao nucleótido 5186.

O plasmídeo pC06 permite a construção de adenovirus recombinantes defectivos contendo uma deleção ao nível do gene E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446, e, portanto, o gene IVa2 foi inativado por inserção de um codão stop na sua fase de leitura, ao nível do sítio Sph1 correspondente à base 5141 do adenovirus Ad5.

A presente invenção descreve igualmente uma série de plasmídeos que permitem a construção de linhagens celulares transcomplementando os adenovirus recombinantes defectivos, em particular o plasmídeo pAC5, que possui o gene IVa2 sob o controle do seu próprio promotor, e os plasmídeos pGY37-TK-IVa2 e pGY37-CMV-IVa2, que contêm o gene IVa2 sob o controle, respectivamente, dos promotores TK e CMV. Estes plasmídeos contêm igualmente as sequências EBNA1/OriP, que lhes permitem replicar-se nas células eucariotes. Estes plasmídeos permitem, portanto, a construção de linhagens celulares que transcomplementam os adenovirus recombinantes defectivos para o gene IVa2, sem que seja necessário utilizar o vírus helper.

A presente invenção refere-se igualmente a qualquer composição farmacêutica compreendendo um ou vários adenovirus recombinantes defectivos, tal como foram anteriormente descritos. As composições farmacêuticas da invenção podem ser formuladas com vista a uma administração por via tópica, oral, parentérica, intranasal, intravenosa, intramuscular, sub-cutânea, intraocular, transdérmica, etc.

Preferencialmente, a composição farmacêutica contém veículos farmaceuticamente aceitáveis para uma formulação injectável. Pode tratar-se, em particular, de soluções salinas (fosfato monossódico, dissódico, cloreto de sódio, de potássio, de cálcio ou de magnésio, etc., ou das misturas dos referidos sais), estéreis, isotónicas, ou composições secas, nomeadamente liofilizadas, que, por adição, conforme os casos, de água esterilizada ou de soro fisiológico, permitem a constituição de soluções injectáveis.

As doses de vírus 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 exprimir, ou ainda da duração do tratamento desejado. De uma maneira geral, os adenovirus recombinantes de acordo com a invenção são formulados e administrados sob a forma de doses compreendidas entre 10^4 e 10^{14} pfu, e de preferência 10^6 a 10^{10} pfu. O termo pfu ("plaque forming unit") [unidade de formação de placas] corresponde ao poder infeccioso de uma solução de vírus, e é determinado por infecção de uma cultura celular apropriada, e mede, geralmente após 5 dias, o número de áreas de células infectadas. As técnicas de determinação do título pfu de uma solução viral estão bem documentadas na literatura.

De acordo com a sequência de ADN heteróloga inserida, os adenovirus da invenção podem ser utilizados para o tratamento ou a prevenção de numerosas patologias, incluindo as doenças genéticas (distrofias, fibrose cística, etc.), as doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, ALS, etc.), os cancros, as patologias ligadas a distúrbios da coagulação ou às dislipoproteinemias, as patologias ligadas às infecções virais (hepatite, SIDA, etc.), etc.

A presente invenção será descrita mais completamente com o auxílio dos exemplos que se seguem, que devem ser considerados como ilustrativos e não limitativos.

Legenda das figuras:

Figura 1: Organização genética do adenovirus Ad5. A sequência completa de Ad5 está disponível na base de dados e permite aos peritos na técnica seleccionar ou criar qualquer sítio de restrição, e assim isolar qualquer região do genoma.

Figura 2: Carta de restrição do adenovirus CAV2, estirpe Manhattan (segundo Apibey *et al.*, acima citado).

Figura 3: Carta de restrição do fragmento HindIII contido no plasmídeo pC01.

Figura 4: Carta de restrição do fragmento HindIII contido no plasmídeo pC02.

Figura 5: Construção e representação do plasmídeo pPY32.

Figura 6: Representação do plasmídeo pPY55.

Figura 7: Construção do plasmídeo pE4Gal.

Figura 8: Carta de restrição do fragmento Hind3 contido no plasmídeo pC06.

Figura 9: Carta de restrição do plasmídeo pAC2.

Figura 10: Carta de restrição do plasmídeo pAC5.

Figura 11: Carta de restrição do plasmídeo pGY37-TK-IVa2.

Figura 12: Carta de restrição do plasmídeo pGY37-CMV-IVa2.

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 electroforèse sobre geles de agarose ou de 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 isopropanol, a transformação em *Escherichia coli*, etc., são bem conhecidas dos peritos na técnica 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 de 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 de acordo com o seu tamanho por electroforèse em geles de agarose ou de acrilamida, extraídos com fenol ou com uma mistura fenol/clorofórmio, precipitados com etanol e depois incubados na presença de ADN-ligase do fago T4 (Biolabs), de acordo com as recomendações do fornecedor.

O enchimento das extremidades 5' salientes pode ser efectuado pelo fragmento de Klenow de ADN-polimerase I de *E. coli* (Biolabs), de acordo com as especificações do fornecedor. A destruição das extremidades 3' salientes é efectuada na presença de ADN-polimerase do fago T4 (Biolabs), utilizada de acordo com as recomendações do fabricante. A destruição das extremidades 5' salientes é efectuada por um tratamento gerido pela nuclease S1.

A mutagénese dirigida *in vitro* por oligodesoxinucleótidos sintéticos pode ser efectuada de acordo com o método desenvolvido por Taylor *et al.*,

[Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764], utilizando o "kit" distribuído por Amersham.

A amplificação enzimática de fragmentos de ADN pela técnica chamada de 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 thermalcycler" (Perkin Elmer Cetus), de acordo com 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 "kit" distribuído por Amersham.

Linhagens celulares utilizadas

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

- Linhagem de rim embrionário humano 293 (Graham *et al.*, J. Gen. Virol 36 (1977) 59). Esta linhagem contém nomeadamente, integrada no seu genoma, a parte esquerda do genoma do adenovirus humano Ad5 (12%).
- Linhagem de células humanas KB: derivada de um carcinoma epidérmico humano, esta linhagem é acessível no ATCC (ref. CCL17), assim como as condições que permitem a sua cultura.
- Linhagem de células humanas Hela: derivada de um carcinoma do epitélio humano, esta linhagem é acessível no ATCC (ref. CCL2), assim como as condições permitindo a sua cultura.

- Linhagem de células caninas MDCK: As condições de cultura das células MDCK foram descritas nomeadamente por Macatney *et al.*, Science 44 (1988) 9.
- Linhagem de células gm DBP6 (Brough *et al.*, Virology 190 (1992) 624). Esta linhagem é constituída por células Hela contendo o gene E2 de adenovirus sob o controle do LTR de MMTV.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Construção do plasmídeo pC01 (figura 3)

A - Construção do plasmídeo pCE

O fragmento EcoRI-XbaI, correspondente à extremidade esquerda do genoma do adenovirus Ad5, foi primeiro clonado entre os sítios EcoRI e XbaI do vector pIC19H. Este gera o plasmídeo pCA. O plasmídeo pCA foi em seguida cortado por HinfI, as suas extremidades 5' salientes foram cheias pelo fragmento de klenow de ADN-polimerase I de E. coli, depois foi cortado por Eco-RI. O fragmento assim gerado do plasmídeo pCA, que contém a extremidade esquerda do genoma do adenovirus Ad5, foi em seguida clonado entre os sítios EcoRI e SmaI do vector pIC20H (Marsh *et al.*, Gene 32 (1984) 481). Isto gera o plasmídeo pCB. O plasmídeo pCB foi em seguida cortado por EcoRI, as suas extremidades 5' salientes foram cheias pelo fragmento de klenow de ADN-polimerase I de E. coli, depois foi cortado por BamHI. O fragmento assim gerado do plasmídeo pCB, que contém a extremidade esquerda do genoma de adenovirus Ad5, foi em seguida clonado entre os sítios NruI e BgIII do vector pIC20H. Isto gera o plasmídeo pCE, do qual uma característica interessante é que possui os 382 primeiros

pares de bases do adenovirus Ad5, seguidos de um "multissítio" de clonagem.

B - Construção do plasmídeo pCD'

O fragmento Sau3A (3346) - SstI (3645) e o fragmento SstI (3645) - NarI (5519) do genoma do adenovirus Ad5 foram primeiro ligados e clonados entre os sítios ClaI e BamHI do vector pLC20H, o que gera o plasmídeo pPY53. O fragmento SalI - TaqI do plasmídeo pPY53, preparado a partir de um contexto dam-, contendo a parte do genoma do adenovirus Ad5 compreendida entre os sítios Sau3A (3346) e TaqI (5207), foi em seguida clonado entre os sítios SalI e ClaI do vector pLC20H, o que gera o plasmídeo pCA'. O fragmento TaqI (5207) - NarI (5519) do genoma do adenovirus Ad5, preparado a partir de um contexto dam-, e o fragmento SalI - TaqI do plasmídeo pCA', foram em seguida ligados e clonados entre os sítios SalI e NarI do vector pLC20H. Isto gera o plasmídeo pCC'. O fragmento NarI (5519) - NruI (6316) do genoma do adenovirus Ad5, preparado a partir de um contexto dam-, e o fragmento SalI - NarI do plasmídeo pCC' foram em seguida ligados e clonados entre os sítios SalI e NruI do vector pLC20R. Isto gera o plasmídeo pCD'.

C - Construção do plasmídeo pC01

Uma digestão parcial por XhoI, mais uma digestão completa por SalI do plasmídeo pCD', gera um fragmento de restrição que contém a sequência do adenovirus Ad5, do sítio Sau3A (3446) ao sítio NruI (6316). Este fragmento foi clonado no sítio SalI do plasmídeo pCE. Isto gera o plasmídeo pC01 (figura 3), que contém a parte esquerda do adenovirus Ad5 até ao sítio HinfI (382), um "multissítio"

de clonagem e o fragmento Sau3A (3446) - NruI (6316) do adenovirus Ad5.

Exemplo 2 - Construção do plasmídeo pC02 (figura 4)

A - Construção do plasmídeo pCD"

O fragmento BssHII-BstEII, correspondendo ao fragmento BssHII (4106) - BstEII (5186) do genoma do adenovirus Ad5, foi primeiro removido do plasmídeo pCA'. Isto gera o plasmídeo pCB", do qual uma característica interessante é que possui uma deleção de uma parte da sequência do gene IVa2. O fragmento TaqI (5207) - NarI (5519) do genoma do adenovirus Ad5, preparado a partir de um contexto dam-, e o fragmento SalI-TaqI do plasmídeo pCB", foram em seguida ligados e clonados entre os sítios SalI e NarI do vector pIC20H. Isto gera o plasmídeo pCC". O fragmento NarI (5519) - NruI (6316) do genoma do adenovirus Ad5, preparado a partir de um contexto dam-, e o fragmento SalI-NarI do plasmídeo pCC", foram em seguida ligados e clonados entre os sítios SalI e NruI do vector pIC20R. Isto gera o plasmídeo pCD".

B - Construção do plasmídeo pC02

Uma digestão parcial por XhoI, depois uma digestão completa por SalI do plasmídeo pCD", gera um fragmento de restrição que contém a sequência do adenovirus Ad5, do sítio Sau3A (3446) ao sítio NruI (6316), cujo fragmento BssHII (4106) - BstEII (5186) foi eliminado. Este fragmento foi clonado no sítio SalI do plasmídeo pCE. Isto gera o plasmídeo pC02 (figura 4), que contém a parte esquerda do adenovirus Ad5 até ao sítio HinfI (382), um "multissítio" de clonagem, e o fragmento Sau3A (3346) - NruI (6316) do

adenovirus Ad5, cujo fragmento BssHII (4106) - BstEII (5186) foi eliminado.

Exemplo 3 - Construção de um adenovirus recombinante contendo uma deleção no gene E1

Este exemplo descreve a construção de um adenovirus recombinante defectivo, contendo uma deleção na região E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446. Este adenovirus é particularmente vantajoso porque contém uma deleção maior ao nível do gene E1, oferecendo mais capacidades de clonagem e, sobretudo, menos riscos de recombinação.

Este adenovirus recombinante foi obtido por recombinação *in vivo*, por cotransfecção nas células 293, na presença de fosfato de cálcio, do ADN do vírus AdRSVf3gal digerido por CPaI e do plasmídeo pCO1 digerido por XmnI. As células são em seguida recolhidas, disruptadas por três ciclos de congelação-descongelação no seu sobrenadante, e depois centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante assim obtido é em seguida amplificado em cultura celular fresca. Os vírus são então purificados a partir de extensões e o seu ADN é analisado de acordo com o método de Hirt (acima citado). São em seguida preparados suprimientos de vírus sobre gradiente de cloreto de cézio.

Exemplo 4 - Construção de um adenovirus recombinante contendo uma deleção nos genes E1 e IVa2

Este exemplo descreve a construção de um adenovirus recombinante defectivo contendo uma deleção na região E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446, mais uma deleção na região IVa2. Este adenovirus é particularmente vantajoso porque, em relação ao adenovirus

descrito no exemplo 3, contém uma deleção ao nível do gene IVa2, oferecendo mais capacidade de clonagem e, sobretudo, menos riscos de produção de proteínas virais *in vivo*.

A - Construção do adenovírus recombinante defeutivo $\Delta E1-\Delta IVa2$ nas linhagens celulares transcomplementando a função E1 (E1+)

O adenovírus recombinante foi preparado de acordo com os cinco protocolos seguintes:

(a) O ADN do vírus AdRSV β gal digerido por ClaI e o plasmídeo pCO2 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células E1+ (293 ou 293 E4) na presença de fosfato de cálcio, para permitir a recombinação *in vivo*.

(b) o ADN do vírus AdRSV β gal digerido por ClaI e por XcaI e o plasmídeo pCO2 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células E1+ (293 ou 293 E4) na presença de fosfato de cálcio, para permitir a recombinação *in vivo*.

(c) O ADN do vírus AdRSV β gal e o plasmídeo pCO2, ambos digeridos por XcaI, são primeiro ligados *in vitro* e depois a construção resultante é transfectada nas células E1+ (293 ou 293 E4) na presença de fosfato de cálcio.

(d) O ADN do vírus AdRSV β gal digerido por ClaI, o ADN do plasmídeo pCO2 digerido por XmnI e o ADN do vírus helper pAC2 foram co-transfectados nas células E1+ (293 ou 293 E4) na presença de fosfato de cálcio.

(e) O ADN do vírus AdRSV β gal digerido por ClaI, o ADN do plasmídeo pCO6 digerido por XmnI e o ADN do vírus helper pAC2 foram co-transfectados nas células E1+ (293 ou 293 E4) na presença de fosfato de cálcio.

(Os plasmídeos pCA2 e pC06 estão descritos no exemplo 7).

Os vírus produzidos são em seguida amplificados e purificados como no exemplo 3.

B - Construção de um adenovirus $\Delta E1-\Delta IVa2$ nas linhagens celulares transcomplementando a função IVa2

Nos clones celulares que exprimem a região IVa2 do adenovirus Ad5, o adenovirus $\Delta E1-\Delta IVa2$ pode ser preparado de acordo com os dois protocolos seguintes:

(a) o ADN do vírus AdRSV β gaI digerido por ClaI e o ADN do plasmídeo pC02 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células na presença de fosfato de cálcio.

(b) O ADN do vírus AdRSV β gaI digerido por ClaI e o ADN do plasmídeo pC06 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células na presença de fosfato de cálcio.

Exemplo 5 - Construção de um adenovirus recombinante contendo uma deleção nos genes E1, E3 e IVa2

Este exemplo descreve a construção de um adenovirus recombinante defectivo contendo uma deleção na região E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446, uma deleção no gene IVa2, e uma deleção na região E3. Este adenovirus é particularmente vantajoso, porque, em relação ao adenovirus descrito no exemplo 4, contém uma deleção ao nível da região E3, oferecendo mais capacidades de clonagem.

O adenovirus recombinante foi preparado de acordo com os três protocolos seguintes:

(a) O ADN do vírus Add1324 digerido por ClaI e o plasmídeo pCO2 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células 293, na presença de fosfato de cálcio, para permitir a recombinação *in vivo*.

(b) O ADN do vírus Add1324 digerido por ClaI e por XcaI e o plasmídeo pCO2 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células 293, na presença de fosfato de cálcio, para permitir a recombinação *in vivo*.

(c) O ADN do vírus Add1324 e o plasmídeo pCO2, ambos digeridos por XcaI, são primeiro ligados *in vitro* e depois a construção resultante é transfectada nas células 293, na presença de fosfato de cálcio.

Os vírus produzidos são em seguida amplificados e purificados como no exemplo 3.

Exemplo 6 - Construção de um adenovirus recombinante contendo uma deleção nos genes E1, E3, E4 e IVa2

Este exemplo descreve a preparação de adenovirus recombinantes defectivos de acordo com a invenção, cujo genoma foi deletado dos genes IVa2, E1, E3 e E4. Estes adenovirus possuem, antes de mais, uma capacidade de incorporação de genes heterólogos importante. Por outro lado, estes vectores apresentam uma segurança elevada, em virtude da deleção da região IVa2 e da região E4. Esta última está, com efeito, implicada na regulação da expressão dos genes tardios, no processamento dos ARN pré-mensageiros tardios, na extinção da expressão das proteínas da célula hospedeira e na eficácia da replicação do ADN viral. Estes vectores possuem, portanto, um ruído de fundo

de transcrição e uma expressão de genes virais muito reduzida. Por fim, de maneira particularmente vantajosa, estes vectores podem ser produzidos com títulos elevados.

A parte direita de um genoma viral, deletada para as regiões E3 e E4 (ver secção B), ou somente para a região E4, como no caso dos vírus dl808, dl1004, dl1007 ou dl1010 descritos por G. Ketner, por exemplo (J. of Virology, 63 (1989) 631). De acordo com uma outra alternativa, a parte direita pode conter deleções em várias regiões e, por exemplo, nas regiões E3 e E4, como as que são construídas *in vitro* e apresentadas no vírus preparado como se segue, a partir do plasmídeo pPY55.

A/ Construção do adenovirus deletado nos genes E1, E3 e E4

A.1 Construção do plasmídeo pPY55

a) Construção do plasmídeo pPY32

O fragmento AvrII-BclI do plasmídeo pFG144 [F. L. Graham et al., EMBO J. 8 (1989) 2077 - 2085], correspondente à extremidade direita do genoma do adenovirus Ad5, foi primeiro clonado entre os sítios XbaI e BamHI do vector pIC19H, preparado a partir de um contexto dam-. Isto gera o plasmídeo pPY23. Uma característica interessante do plasmídeo pPY23 é que o sítio SalI proveniente do "multissítio" de clonagem do vector pIC19H permanece único e que está localizado ao lado da extremidade direita do genoma do adenovirus Ad5. O fragmento HaeIII-SalI do plasmídeo pPY23, que contém a extremidade direita do genoma do adenovirus Ad5, a partir do sítio HaeIII localizado em posição 35614, foi em seguida clonado entre os sítios EcoRV e XhoI do vector pIC20H, o que gera o plasmídeo pPY29. Uma característica interessante deste plasmídeo é que os sítios XbaI e ClaI provenientes do

"multissítio" de clonagem do vector plC20H estão localizados ao lado da junção EcoRV/HaeIII resultante da clonagem. Além disso, esta junção modifica o contexto nucleotídico imediatamente adjacente ao sítio ClaI, que se tornou agora metilável num contexto dam+. O fragmento XbaI (30470) - MaeII (32811) do genoma do adenovirus Ad5 foi em seguida clonado entre os sítios XbaI e ClaI do plasmídeo pPY29 preparado a partir de um contexto dam-, o que gera o plasmídeo pPY30. O fragmento AstI do plasmídeo pPY30, que corresponde à sequência do genoma do adenovirus Ad5 do sítio SstI em posição 30556 até à extremidade direita, foi por fim clonado entre os sítios SstI do vector plC20H, o que gera o plasmídeo pPY31, do qual uma carta de restrição do inserto localizado entre os sítios HindIII é dada na Figura 5.

O plasmídeo pPY32 foi obtido após a digestão parcial do plasmídeo pPY31 por BgIII, seguida de uma digestão total por BamHI, e depois religação. O plasmídeo pPY32 corresponde, portanto, à deleção do genoma do adenovirus Ad5 situada entre o sítio BamHI do plasmídeo pPY31 e o sítio BgIII localizado em posição 30818. Uma carta de restrição do fragmento HindIII do plasmídeo pPY32 é dada na Figura 5. Uma característica do plasmídeo pPY32 é que ele possui sítios SalI e XbaI únicos.

b) Construção do plasmídeo pPY47

O fragmento BamHI (21562) - XbaI (28592) do genoma do adenovirus Ad5 foi primeiro clonado entre os sítios BamHI e XbaI do vector plC19H preparado a partir de um contexto dam-, o que gera o plasmídeo pPY17. Este plasmídeo contém, portanto, um fragmento HindIII (26328) - BgIII (28133) do genoma do adenovirus Ad5, que pode ser clonado entre os sítios HindIII e BgIII do vector plC20R, para gerar o

plasmídeo PPY34. Uma característica deste plasmídeo é que o sítio BamHI proveniente do "multissítio" de clonagem está localizado na proximidade imediata do sítio HindIII (26328) do genoma do adenovirus Ad5.

O fragmento BamHI (21562) - HindIII (26328) do genoma do adenovirus Ad5 proveniente do plasmídeo pPY17 foi em seguida clonado entre os sítios BamHI e HindIII do plasmídeo pPY34, o que gera o plasmídeo pPY39. O fragmento BamHI - XbaI do plasmídeo pPY39, preparado a partir de um contexto dam-, contendo a parte do genoma do adenovirus Ad5 compreendida entre os sítios BamHI (21562) e BgIII (28133), foi em seguida clonada entre os sítios BamHI e XbaI do vector pIC19H preparado a partir de um contexto dam-. Isto gera o plasmídeo pPY47, do qual uma característica interessante é que o sítio SalI proveniente do "multissítio" de clonagem está localizado na proximidade do sítio HindIII (Figura 6).

c) Construção do plasmídeo pPY55

O fragmento SalI-XbaI do plasmídeo pPY47 preparado a partir de um contexto dam-, e que contém a parte do genoma do adenovirus Ad5 que se estende do sítio BamHI (21562) até ao sítio BgIII (28133), foi clonado entre os sítios SalI e XbaI do plasmídeo pPY32, o que gera o plasmídeo pPY55. Este plasmídeo é directamente utilizável para a obtenção de adenovirus recombinantes, pelo menos deletados para a região E3 (deleção entre os sítios BgIII localizados nas posições 28133 e 30818 do genoma do adenovirus Ad5) e para a região E4 na sua integralidade (deleção entre os sítios MaeII (32811) e HaeIII (35614) do genoma do adenovirus Ad5 (Figura 6).

A.2. Construção do plasmídeo pE4Gal

Para o efeito, foi construído um plasmídeo contendo os ITR de junção do Ad5, a sequência de encapsidação, o gene E4 sob o controle do seu próprio promotor e, como gene heterólogo, o gene LacZ sob o controle do promotor LTR do vírus RSV (figura 7). Este plasmídeo, designado por pE4Gal, foi obtido por clonagem e ligação dos seguintes fragmentos (ver figura 7):

- fragmento HindIII-SacII proveniente do plasmídeo pFG144 (Graham *et al.*, EMBO J. 8 (1989) 2077). Este fragmento contém as sequências ITR do Ad5 "invertidas" e a sequência de encapsidação: fragmento HindIII (34920) - SacII (352).
- fragmento de Ad5 compreendido entre os sítios SacII (localizado ao nível do par de bases 3827) e PstI (localizado ao nível do par de bases 4245);
- fragmento de pSP 72 (Promega) compreendido entre os sítios PstI (pb 32) e SalI (pb 34);
- fragmento XhoI-XbaI do plasmídeo pAdLTR GalIX descrito em Stratford-Perricaudet *et al.* (JCI 90 (1992) 626). Este fragmento contém o gene LacZ sob o controle do LTR do vírus RSV.
- fragmento XbaI (pb 40) - NdeI (pb2379) do plasmídeo pSP72;
- fragmento NdeI (pb 31089) - HindIII (pb 34930) do Ad5. Este fragmento localizado na extremidade direita do genoma do Ad5 contém a região E4 sob o controle do seu próprio promotor. Foi clonado ao nível dos sítios NdeI (2379) do plasmídeo pSP 72 e HindIII do primeiro fragmento.

Este plasmídeo foi obtido por clonagem dos diferentes fragmentos nas regiões indicadas do plasmídeo pSP 72. Bem entendido, são fragmentos equivalentes.

A.3. Co-transfecção nas células 293

Os adenovirus são obtidos por recombinação *in vivo*, de acordo com as seguintes estratégias:

- (i) O ADN do vírus Ad-d1324 (Thimmappaya *et al.*, Cell. 31 (1982) 543) e o plasmídeo pPY55, ambos digeridos por BamHI, são primeiro ligados *in vitro*, depois co-transfectados com o plasmídeo pE4Gal nas células 293.
- (ii) O ADN do vírus Ad-d1324 digerido por EcoRI e o plasmídeo pPY55 digerido por BamHI são co-transfectados, com o plasmídeo pE4Gal, nas células 293.
- (iii) O ADN do adenovirus Ad5 e o plasmídeo pPY55, ambos digeridos por BamHI, são ligados e depois co-transfectados com o plasmídeo pE4Gal nas células 293.
- (iv) O ADN do adenovirus Ad5 digerido por EcoRI e o plasmídeo pPY55 digerido por BamHI são co-transfectados com o pE4Gal nas células 293.

As estratégias (i) e (ii) permitem gerar um adenovirus recombinante deletado para as regiões E1, E3 e E4; as estratégias (iii) e (iv) permitem gerar um adenovirus recombinante deletado para as regiões E3 e E4. Por outro lado, é igualmente possível utilizar uma linhagem celular derivada de uma linhagem que exprime a região E1, por exemplo, a linhagem 293, e exprimindo igualmente pelo menos as fases abertas ORF6 e ORF6/7 da região E4 do adenovirus Ad5 (ver FR93 08596). A utilização das referidas linhagens permite evitar o emprego do plasmídeo pE4Gal.

B/ Construção do adenovirus deletado nos genes IVa2, E1, E3 e E4.

Este adenovirus foi obtido por recombinação, após a co-transfecção nas células 293 do plasmídeo pC02 (exemplo 2) e a parte direita de um adenovirus pelo menos deletado para a região E4, e, por exemplo, o adenovirus obtido após a utilização do plasmídeo pPY55 (ver secção A).

Após a co-transfecção com fosfato de cálcio, as células são recolhidas, disruptadas por três ciclos de congelação-descongelação no seu sobrenadante, depois centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 10 minutos. O sobrenadante assim obtido é em seguida amplificado sobre cultura celular fresca. Os vírus são então purificados a partir de áreas e o seu ADN é analisado de acordo com o método de Hirt (acima citado). São em seguida preparados suprimentos de vírus sobre gradiente de cloreto de cézio.

Exemplo 7 - Construção de um adenovirus recombinante contendo uma deleção nos genes E1, E4, IVa2

A - Construção do plasmídeo pC06 (figura 8)

A.1 - Construção do plasmídeo pGY38

O fragmento MunI-NruI do plasmídeo pC01 contendo as sequências do genoma do adenovirus Ad5 que se estende das bases 3924 a 6316 e nomeadamente o gene IVa2 (bases 4094 a 5719) foi clonado entre os sítios MunI e NruI do vector comercial pSL1180. Isto gera o plasmídeo pGY38.

A.2 - Construção do plasmídeo pGY39

A sequência nucleotídica seguinte, e a sua espiral complementar, foram sintetizadas artificialmente por técnicas clássicas de biologia molecular:

5'- CCT TAG CCC GGG CTA AGG CAT G - 3' (SEQ ID nº1)

Cada uma das espirais possui um sítio de restrição Sph1 na sua extremidade 3'. Esta sequência foi clonada no sítio Sph1 do plasmídeo pGY38: esta introduz um codão stop na parte codificante do gene IVa2, no sítio Sph1 correspondente à base 5141 do adenovirus Ad5. Isto gera o plasmídeo pGY39. Neste plasmídeo, o gene IVa2 assim modificado está inativado: este codifica uma proteína inactiva correspondente aos 102 primeiros ácidos aminados da proteína IVa2 selvagem.

A.3 - Construção do plasmídeo pC06

O fragmento Mun1 e Nru1 do plasmídeo pGY39 foi clonado entre os sítios Mun1 e NruI do plasmídeo pC01. Isto gera o plasmídeo pC06 (figura 8), que contém a parte esquerda do adenovirus Ad5 até ao sítio Hinf1 (382), um "multissítio" de clonagem, o fragmento Sau3A (3446) - Sph1 (5141) do adenovirus Ad5, oligonucleótido fornecendo um codão stop na sequência codificante do gene IVa2 e o fragmento Sph1 (5141) - Nru1 (6316) do adenovirus Ad5.

B - Construção do plasmídeo pAC2 (figura 9)

B.1 - Construção do plasmídeo pSPITR

Foram clonados os seguintes fragmentos:

- fragmento Hind3 (34930) - Sac2 (357) derivado do plasmídeo pFG144 (Graham *et al.*, EMBO J. 8, 1989, 2027); este fragmento contém as sequências ITR do adenovirus Ad5 "invertidas" e a sequência de encapsidação.
- fragmento do adenovirus Ad5 compreendido entre os sítios Sac2 (localizado ao nível da base 3827 no Ad5) e Pst1 (localizado ao nível da base 4225).

Em seguida o plasmídeo pSPITR foi obtido por ligação destes fragmentos entre os sítios Hind3 e Pst 1 do plasmídeo comercial pSP72.

B.2 - Construção do plasmídeo pAC2

O fragmento Dra1 - Nru1 do plasmídeo pC01, que contém as sequências do genoma do adenovirus Ad5 que se estendem das bases 4029 a 6316 e nomeadamente o gene IVa2 e o seu promotor, foi clonado no sítio EcoRV do vector p1C20H (Ref. J. L. Marsh *et al.*, (1984) Gene, 32, 481-485). Isto gera o plasmídeo pAC1. O fragmento Bgl2-BamHI do plasmídeo pAC1 foi clonado no sítio BamHI do plasmídeo pSPITR, o que gera o plasmídeo pAC2 (figura 9).

C - Construção do plasmídeo pAC5 (figura 10)

C.1 - Construção do plasmídeo pAC3

O fragmento EcoR1-Xba1 do plasmídeo comercial pMEP4 (Invitrogen) foi ligado entre os sítios EcoR1 e Xba1 do plasmídeo pAC1. Isto gera o plasmídeo pAC3, do qual uma característica é o facto de conter as sequências EBNA1-oriP e o gene IVa2.

C.2 - Construção do plasmídeo pAC5

O fragmento SalI-XhoI do plasmídeo comercial pMSCV foi clonado no sítio SalI do vector pLC20H. Isto gera o plasmídeo pAC4 que contém o gene Neo. O fragmento XbaI-NruI do plasmídeo pAC3 foi clonado entre os sítios XbaI e NruI do plasmídeo pAC4. Isto gera o plasmídeo pAC5 (figura 10), do qual uma característica importante é que ele possui o gene Néo e o gene IVa2 sob o controle do seu próprio promotor. Além disso, este plasmídeo pode-se replicar nas células eucariotes, visto que ele contém as sequências EBNA1/OriP.

D - Construção do plasmídeo pGY37-TK-IVa2 (figura 11)

D.1 - Construção do plasmídeo pGY32

A sequência nucleotídica seguinte, e a sua espiral complementar, foram sintetizadas artificialmente pelas técnicas clássicas de biologia molecular:

5'-TCG ACG GAT CCC TTA AGG TTG ACG CCG CCA CCA TGG AAA CCA
GAG GGC GAA GAC CGG CAG C-3' (SEQ ID n°2).

Esta contém um sítio de restrição para SalI na sua extremidade 5' e um sítio de restrição para Eco47III na sua extremidade 3'. Esta sequência foi inserida no plasmídeo pAC1 entre o sítio SalI e o sítio Eco47III do início do gene IVa2, que corresponde à base 5411 da sequência do adenovirus Ad5. Isto gera o plasmídeo pGY32, do qual uma característica importante é o facto de possuir um "multissítio" de clonagem (BamHI, Afl2, Hinc2) a montante de um consenso Kozak antes do ATG do gene IVa2. Além disso, nesta construção, o intrão do gene IVa2 foi suprimido.

D.2 - Construção do plasmídeo pGY33-TK

O fragmento BamH1 (-110) - Hinc2 (+35) do promotor TK do plasmídeo pX4B (B. Wasylyk *et al.*, N.A.R. (1987), 15, 13, 5490) e um "multissítio" de clonagem limitado pelos sítios SalI e BamH1 foram ligados e depois clonados entre os sítios SalI e Hinc2 do plasmídeo PGY32. Isto gera o plasmídeo pGY33-TK, do qual uma característica interessante é que este contém o gene IVa2 desprovido de intrão sob o controle do promotor TK.

D.3 - Construção do plasmídeo pGY34

Os seguintes fragmentos foram preparados e depois ligados:

- o fragmento XbaI - PvuI do plasmídeo comercial pMEP4 (5,5 kb); este fragmento contém as sequências EBNA1/OriP e a extremidade 5' do gene de resistência à ampicilina,
- o fragmento PvuI - AlwNI do plasmídeo comercial pMEP4 (0,8kb); este fragmento contém a extremidade 3' do gene de resistência à ampicilina e uma parte da origem de replicação,
- o fragmento XbaI e AlwNI do plasmídeo plC20H (0,8kb); este fragmento contém o final da origem de replicação.

Isto gera o plasmídeo pGY34, que contém as sequências EBNA1/OriP.

D.4 - Construção do plasmídeo pGY36

O fragmento BamHI do plasmídeo comercial pUT614 (Cayla) foi clonado no sítio BamHI do vector plC20H. Isto gera o plasmídeo pPY9, que contém o gene Zéo. O fragmento

Xba - EcoRV do plasmídeo pPY9 foi clonado entre os sítios XbaI e NruI do vector pIC20R, o que gera o plasmídeo pGY35. O fragmento XbaI do plasmídeo pGY35, preparado num contexto dam-, foi em seguida clonado no sítio XbaI do plasmídeo pGY34. Isto gera o plasmídeo pGY36.

D.5 - Construção do plasmídeo pGY37-TK-IVa2 (figura 11)

O fragmento Bgl2 - SapI do plasmídeo pGY33-TK foi clonado entre os sítios Bgl2 e SapI do plasmídeo pGY36. Isto gera o plasmídeo pGY37-TK-IVa2 (figura 11), do qual uma característica importante é que possui o gene Zéo e o gene IVa2, sem intrão, sob o controle do promotor TK. Além disso, este plasmídeo pode-se replicar nas células eucariotes, visto que contém as sequências EBNA1-OriP.

E - Construção do plasmídeo pGY37-CMV-IVa2 (figura 12)

E.1 - Construção do plasmídeo pGY33-CMV

O fragmento Bgl2 - Afl2 do plasmídeo comercial pC1 (promega) foi clonado entre os sítios BamHI e Afl2 do plasmídeo pGY32. Isto gera o plasmídeo pGY33-CMV, do qual uma característica interessante é o facto de conter o gene IVa2 desprovido de intrão, sob o controle do promotor CMV.

E.2 - Construção do plasmídeo pGY37-CMV-IVa2 (figura 12)

O fragmento Bgl2 - SapI do plasmídeo pGY33-CMV foi clonado entre os sítios Bgl2 e SapI do plasmídeo pGY36. Isto gera o plasmídeo pGY37-CMV-IVa2 (figura 12), do qual uma característica importante é que ele possui o gene Zéo e o gene IVa2, sem intrão, sob o controle do promotor CMV. Além disso, este plasmídeo pode replicar-se nas células eucariotes, visto que contém as sequências EBNA1/OriP.

F - Construção de clones celulares que exprimem a região IVa2 do adenovirus Ad5

Diferentes tipos de linhagens celulares, trans-complementando a função IVa2, foram construídos nas células E1+ (células 293 ou 293 E4):

(a) o plasmídeo pAC5 foi transfectado nas células 293 na presença de fosfato de cálcio, e os clones celulares contendo o plasmídeo replicativo pAC5 foram seleccionados na presença de geneticina (Sigma, 400 µg/ml).

(b) o plasmídeo pGY37-TK-IVa2 foi transfectado nas células na presença de fosfato de cálcio, e os clones celulares contendo o plasmídeo replicativo pGY37-TK-IVa2 foram seleccionados na presença de fleomicina (Cayla, 15 µg/ml para as células 293 e 30 µg/ml para as células 293 E4).

(c) o plasmídeo pGY37-CMV-IVa2 foi transfectado nas células na presença de fosfato de cálcio, e os clones celulares contendo o plasmídeo replicativo pGY37-CMV-IVa2 foram seleccionados na presença de fleomicina (Cayla, 15 µg/ml para as células 293 e 30 µg/ml para as células 293 E4).

Mais precisamente, em cada um destes três casos, células em caixas de 5 cm de diâmetro foram transfectadas por 1 a 5 µg de plasmídeo na presença de fosfato de cálcio. Após a transfecção das células, estas são lavadas, em seguida o meio de cultura (MEM, Sigma) é suplementado em

soro de vitela fetal (7% final), é adicionado e as células são postas a incubar durante 24 horas. No dia seguinte, seleccionam-se as células na presença de geneticina ou fleomicina. A geneticina ou a fleomicina é mudada de três em três dias e os clones seleccionáveis aparecem após cerca de três semanas. Quando todas as células não transfectadas estão mortas, somente as células transfectadas se dividem para gerar clones celulares. Quando os clones celulares estão suficientemente grandes para ser visíveis a olho nu, são individualmente transferidos para cavidades de cultura de uma placa de cultura "24 buracos". Cada clone é em seguida progressivamente amplificado, na presença de geneticina ou fleomicina, primeiro nas cavidades de uma placa de cultura "12 buracos", depois "6 buracos", para ser em seguida amplificado em caixas de cultura celular.

G - Construção de um adenovirus recombinante contendo uma deleção nos genes E1-IVa2-E4

G.1 - Construção de um adenovirus $\Delta E1-\Delta IVa2-\Delta E4$ por co-transfecção de um vírus helper contendo o gene IVa2

Por exemplo, o adenovirus $\Delta E1-\Delta IVa2-\Delta E4$ pode ser preparado de acordo com os dois protocolos seguintes:

(a) o ADN de um vírus $\Delta E1-\Delta E4$ digerido por ClaI (por exemplo, AdRSV β gaI-d11004, AdRSV β gaI-d11007 ou AdRSV β gaI-d11014 descrito em "Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit", de P. YEH *et al.*, J. Virology, sous-*presse*), o ADN do plasmídeo pCO2 digerido por XmnI e o ADN do vírus helper pAC2 foram co-transfectados nas células 293 E4 na presença de fosfato de cálcio.

(b) o ADN de um vírus $\Delta E1-\Delta E4$ digerido por ClaI, o ADN do plasmídeo pC06 digerido por XmnI e o ADN do vírus helper pAC2 foram co-transfectados nas células 293 E4 na presença de fosfato de cálcio.

G.2 - Construção de um adenovírus $\Delta E1-\Delta IVa2-\Delta E4$ nas linhagens celulares transcomplementando as funções IVa2 e E4

Nos clones celulares que exprimem as regiões IVa2 e E4 do adenovírus Ad5 e resistentes à fleomicina, o adenovírus $\Delta E1-\Delta IVa2-\Delta E4$ pode ser preparado de acordo com os dois protocolos seguintes:

(a) o ADN de um vírus $\Delta E1-\Delta E4$ digerido por ClaI e o ADN do plasmídeo pC02 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células na presença de fosfato de cálcio.

(b) o ADN de um vírus $\Delta E1-\Delta E4$ digerido por ClaI e o ADN do plasmídeo pC06 digerido por XmnI foram co-transfectados nas células na presença de fosfato de cálcio.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÕES GERAIS

(i) DEPOSITANTE:

- (A) NOME: RHONE POULENC RORER S.A.
- (B) RUA: 20, Avenida Raymond Aron
- (C) CIDADE: ANTONY
- (E) PAÍS: FRANÇA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 92165
- (G) TELEFONE: 40.91.69.22
- (H) TELEFAX: (1) 40.91.72.96

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Vectores virais e utilização em terapia com genes

(iii) NÚMERO DAS SEQUÊNCIAS: 2

(iv) FORMA DECIFRÁVEL POR COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE SUPORTE: fita
- (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
- (C) SISTEMA DE EXPLORAÇÃO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) *SOFTWARE*: PatentIn Release #1.0; versão #1.30 (OEB)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 22 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE ESPIRAIS: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNC

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

CCTTAGCCCCG GGCTAAGGCA TG

22

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 61 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE ESPIRAIS: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

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

TCGACGGATC CCTTAAGGTT GACGCCGCCA CCATGGAAAC
CAGAGGGCGA AGACCGGCAG

61

Lisboa, 25 de Setembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Adenovirus recombinante defeutivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por o gene IVa2 pelo menos estar inativado.
2. Adenovirus recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o gene IVa2 estar inativado por mutação e/ou deleção de uma ou de várias bases.
3. Adenovirus recombinante de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o gene IVa2 estar inativado por deleção parcial.
4. Adenovirus recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o gene IVa2 estar inativado por deleção de um fragmento que se estende do nucleótido 4106 ao nucleótido 5186.
5. Adenovirus recombinante de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por compreender uma sequência de ácido nucleico heteróloga.
6. Adenovirus recombinante defeutivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção de todos ou parte dos genes E1 e IVa2.
7. Adenovirus recombinante defeutivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção ao nível do gene E1, que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446, e uma deleção ao

nível do gene IVa2, que se estende do nucleótido 4106 ao nucleótido 5186.

8. Adenovirus recombinante defectivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção de todos ou parte dos genes E4 e IVa2.
9. Adenovirus recombinante defectivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2 e E3.
10. Adenovirus recombinante defectivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2 e E4.
11. Adenovirus recombinante defectivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2, E3 e E4.
12. Adenovirus recombinante defectivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por conter uma deleção de todos ou parte dos genes E1, IVa2, E3, L5 e E4.
13. Adenovirus de acordo com uma das reivindicações anteriores, caracterizado por ter origem humana, animal ou mista.
14. Adenovirus de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por os adenovirus de origem humana serem

escolhidos entre os que são classificados no grupo C, de preferência entre os adenovirus de tipo 2 ou 5 (Ad2 ou Ad5).

15. Adenovirus de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por os adenovirus de origem animal serem escolhidos entre os adenovirus de origem canina, bovina, murina, ovina, porcina, aviária ou simíesca.
16. Adenovirus de acordo com uma das reivindicações anteriores, caracterizado por compreender, adicionalmente, uma parte do gene E3 que codificam para a proteína gp19K sob o controle de um promotor heterólogo.
17. Adenovirus de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a sequência de ácido nucleico heteróloga compreender um gene terapêutico e/ou um gene que codifica para peptídeos antigénicos.
18. Adenovirus de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a sequência de ácido nucleico heteróloga compreender igualmente uma região promotora da transcrição funcional na célula, no órgão e/ou no organismo infectado.
19. Adenovirus de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a sequência de ácido nucleico heteróloga compreender, adicionalmente, uma sequência de secreção.
20. Adenovirus recombinante defectivo, caracterizado por compreender os ITR e uma região de encapsidação, e por

conter uma deleção que se estende do nucleótido 382 ao nucleótido 3446.

21. Composição farmacêutica, compreendendo pelo menos um adenovirus recombinante defectivo de acordo com uma das reivindicações 1 a 20.
22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 21, compreendendo um veiculo farmaceuticamente aceitável para uma formulação injectável.

Lisboa, 25 de Setembro de 2006

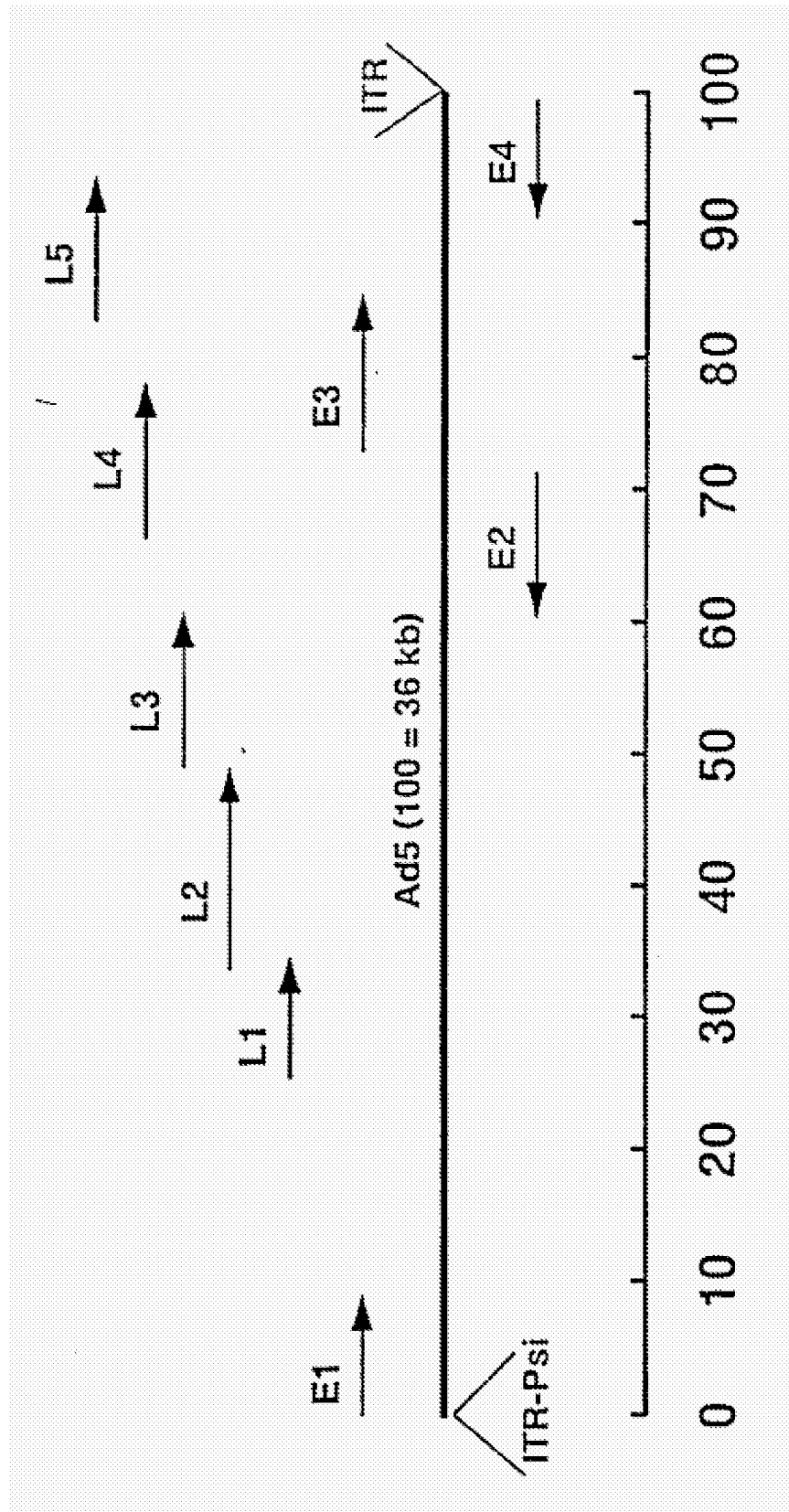


FIGURA 1

2/12

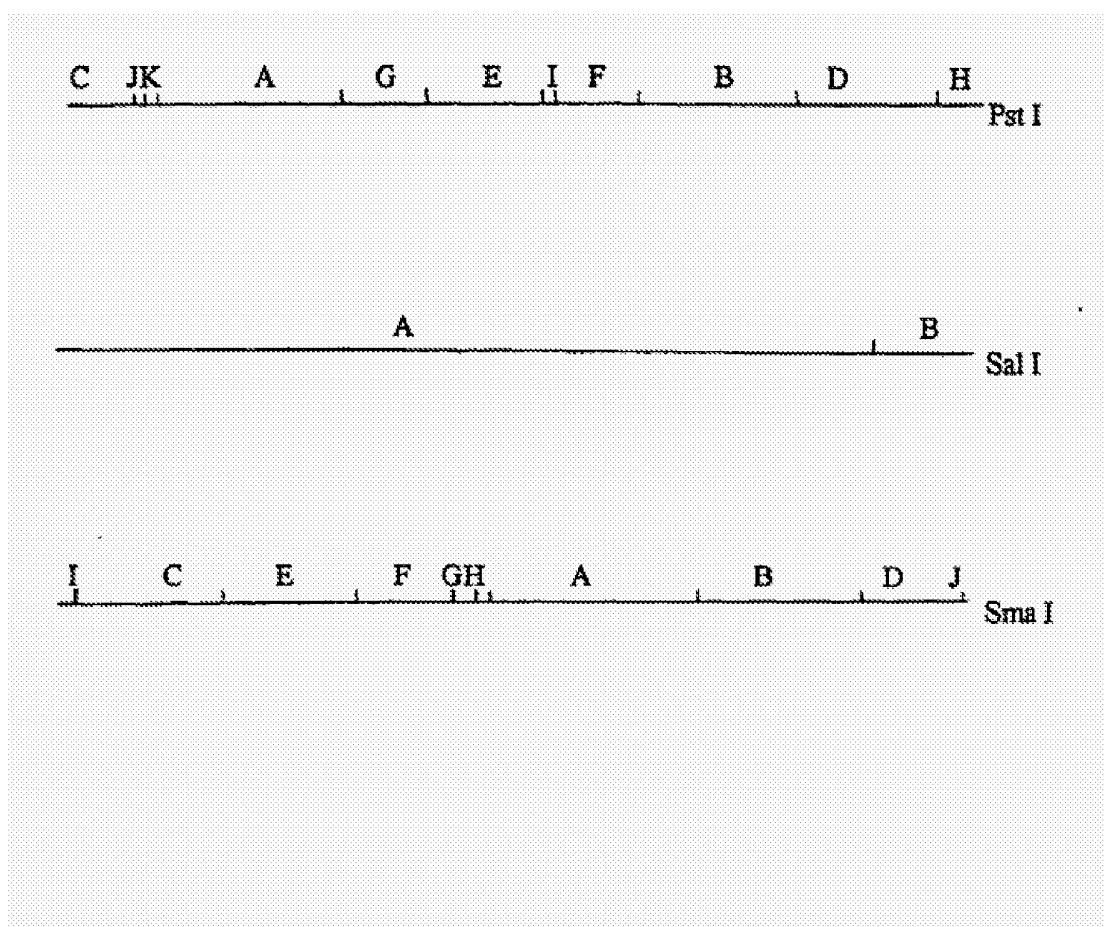


FIGURA 2

3/12

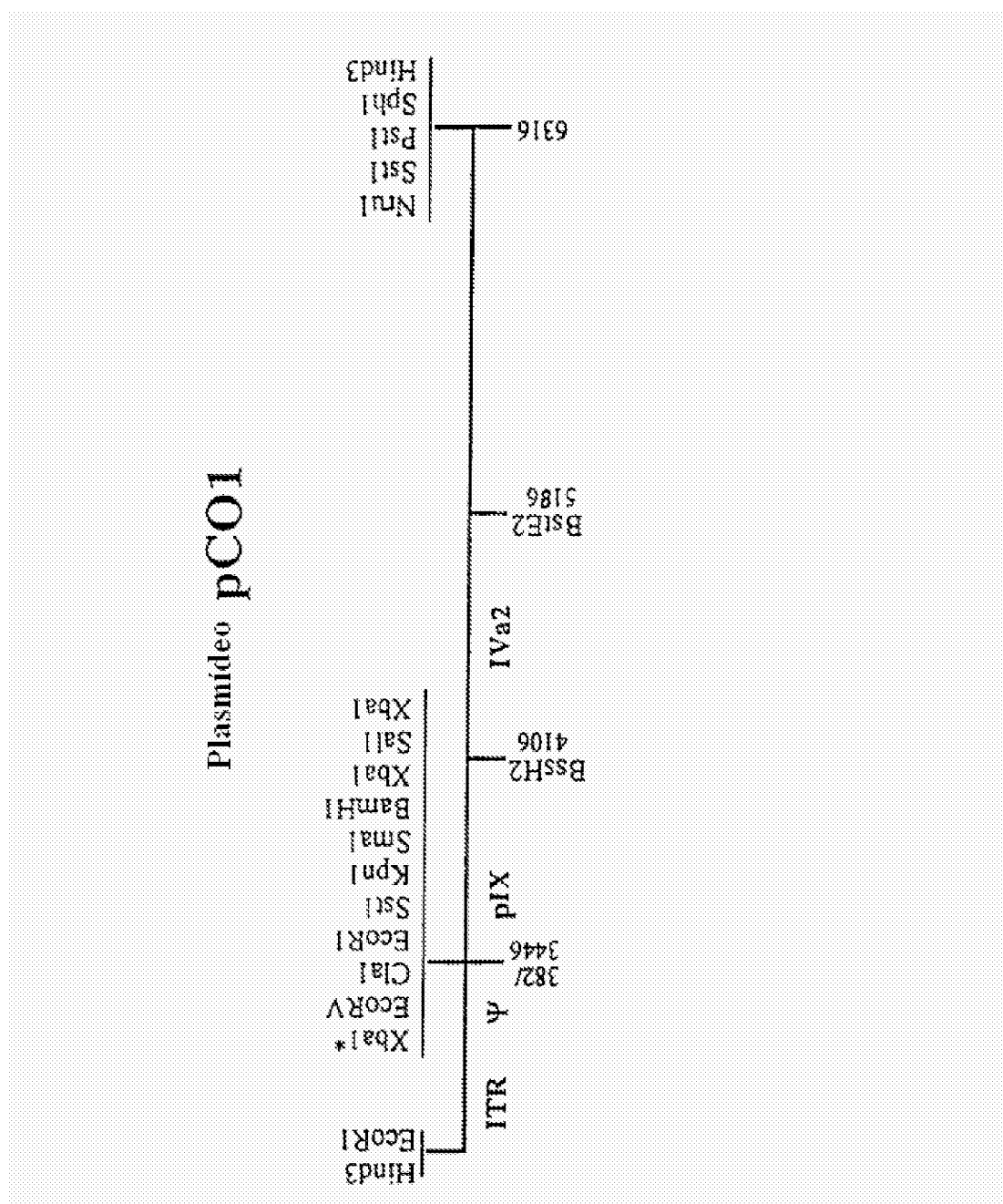


FIGURA 3

4/12

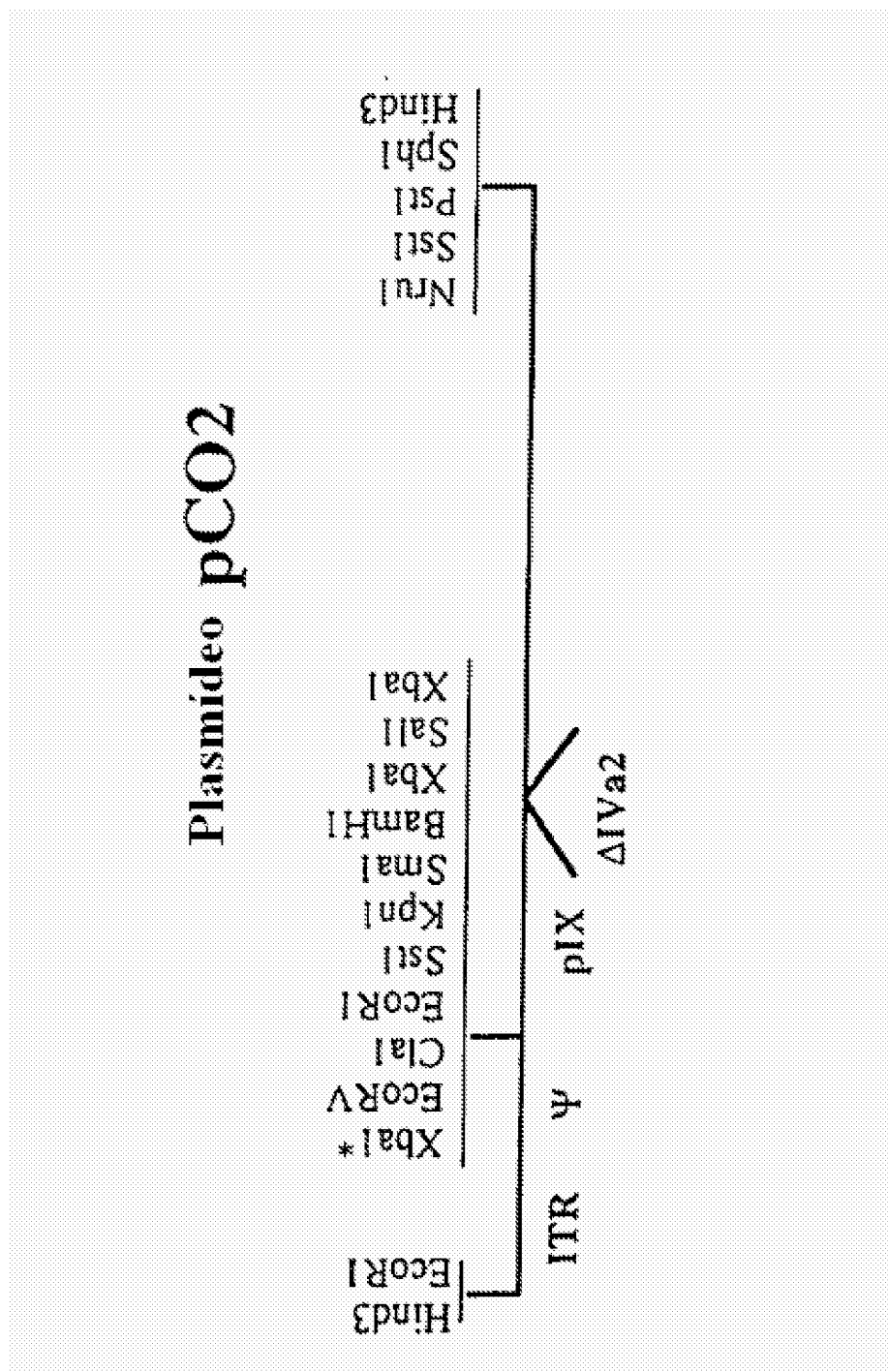


FIGURA 4

5/12

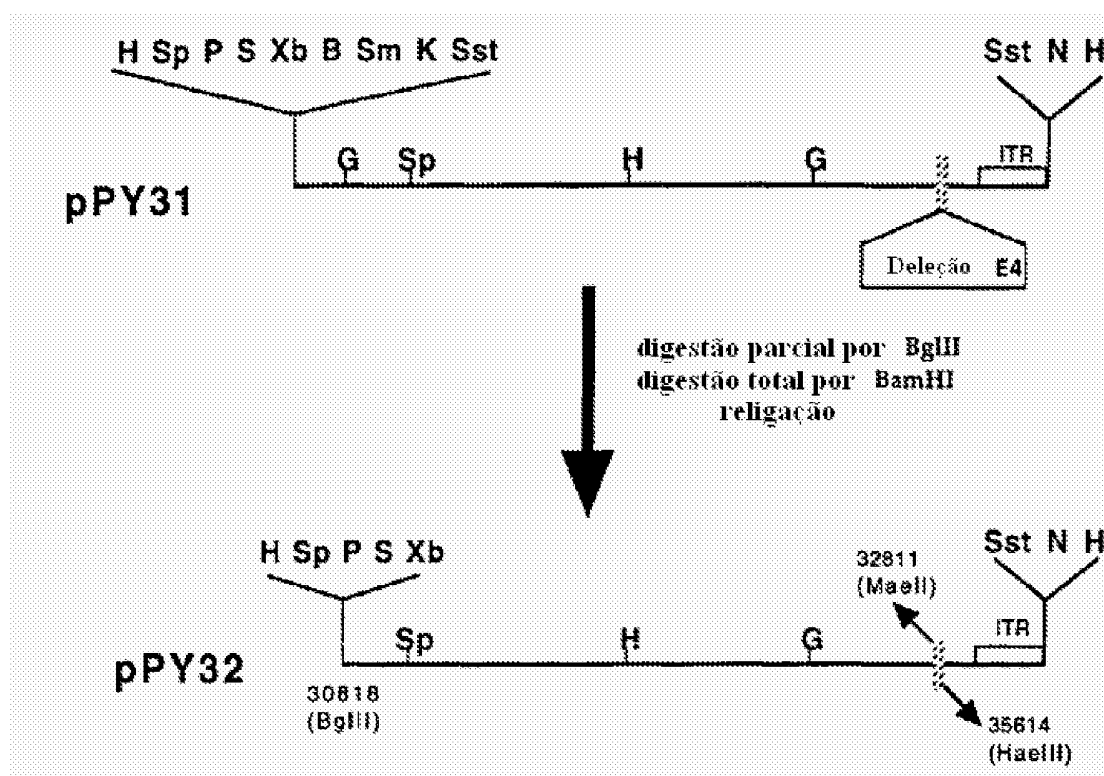


FIGURA 5

6/12

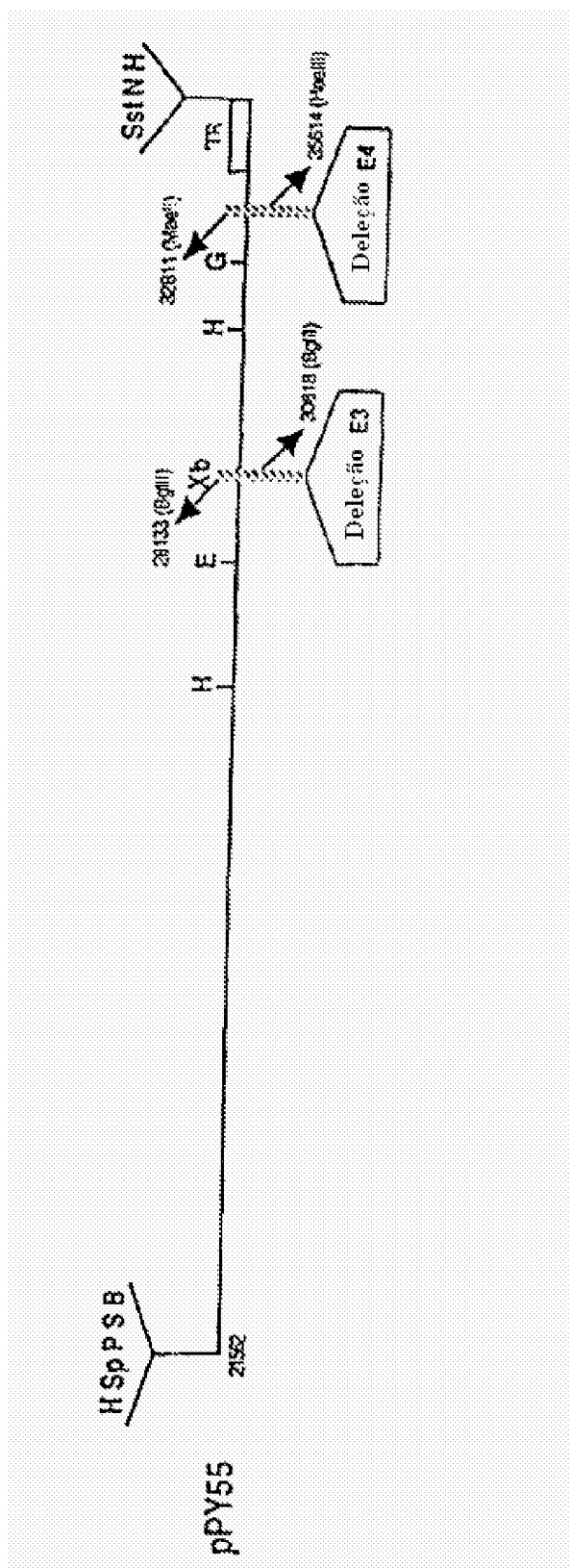


FIGURA 6

7/12

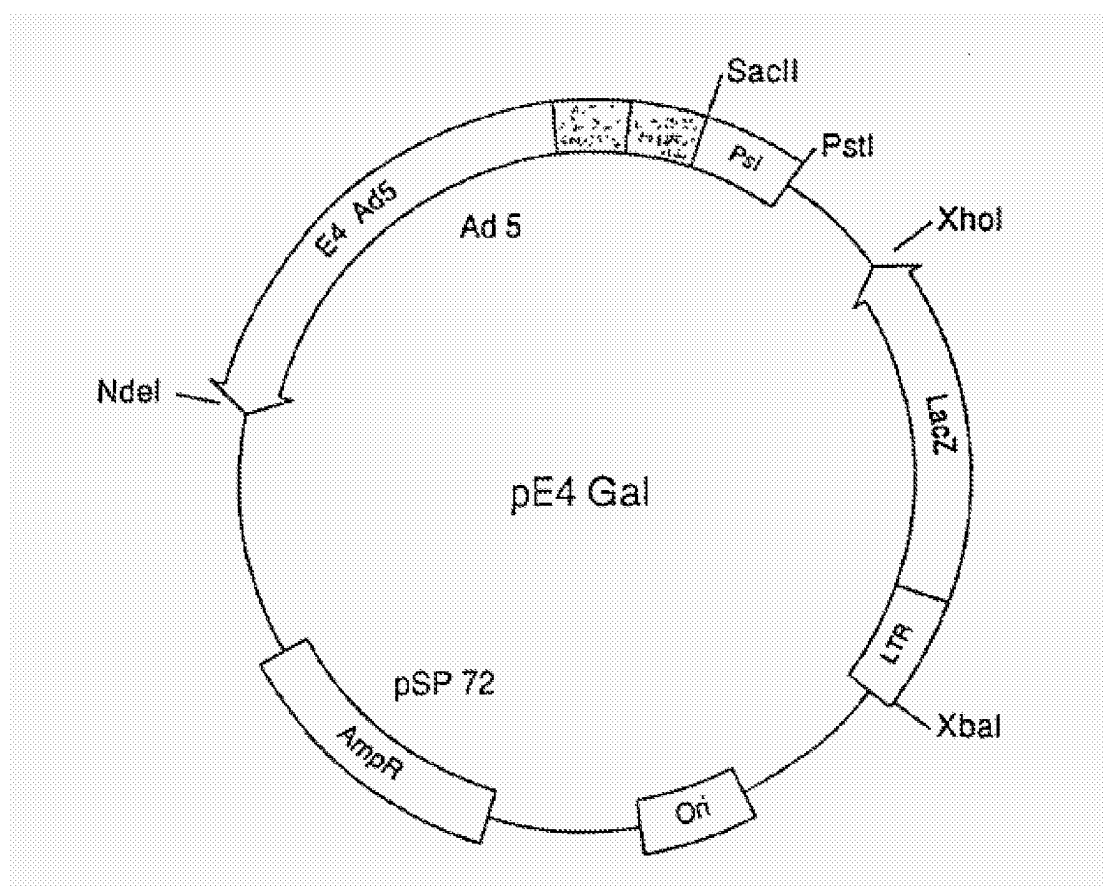


FIGURA 7

8/12

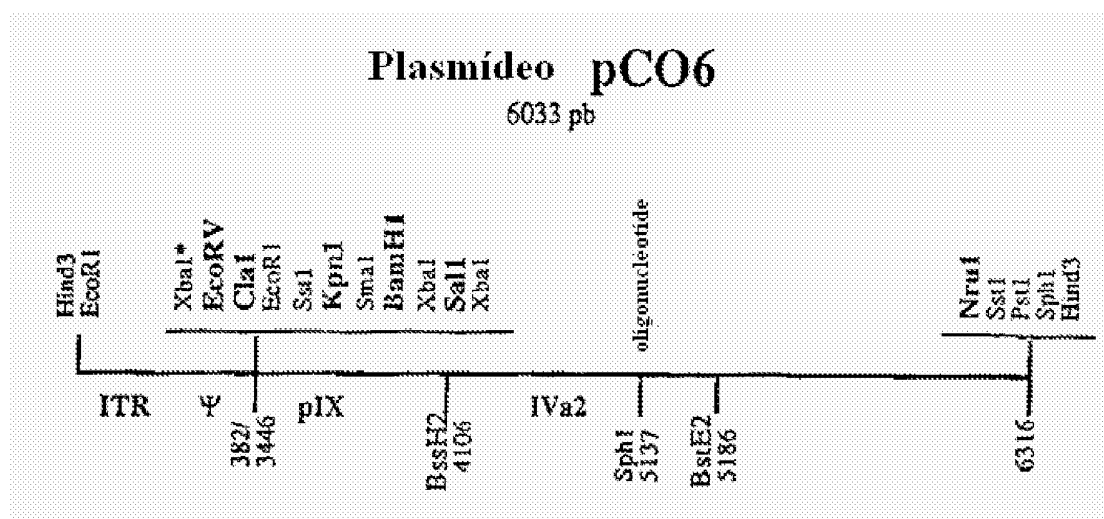


FIGURA 8

9/12

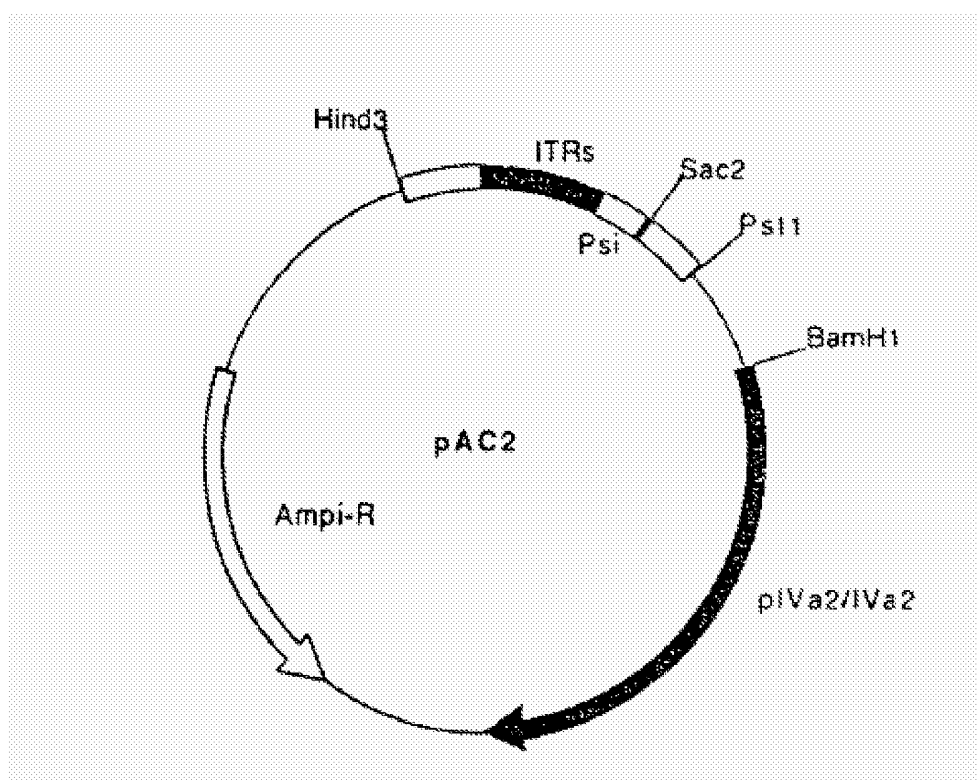


FIGURA 9

10/12

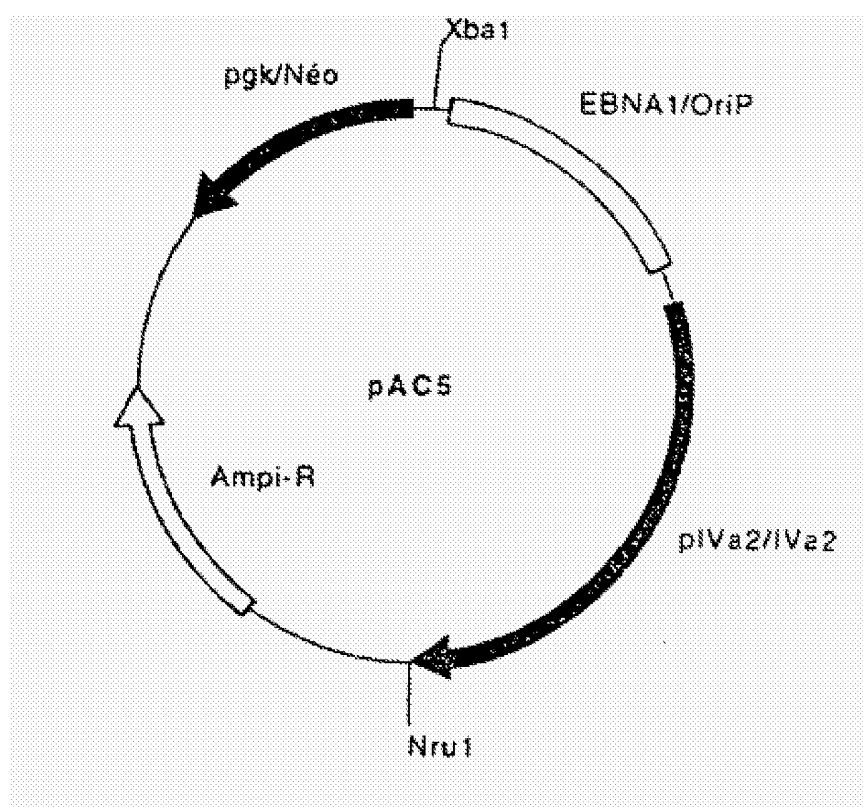


FIGURA 10

11/12

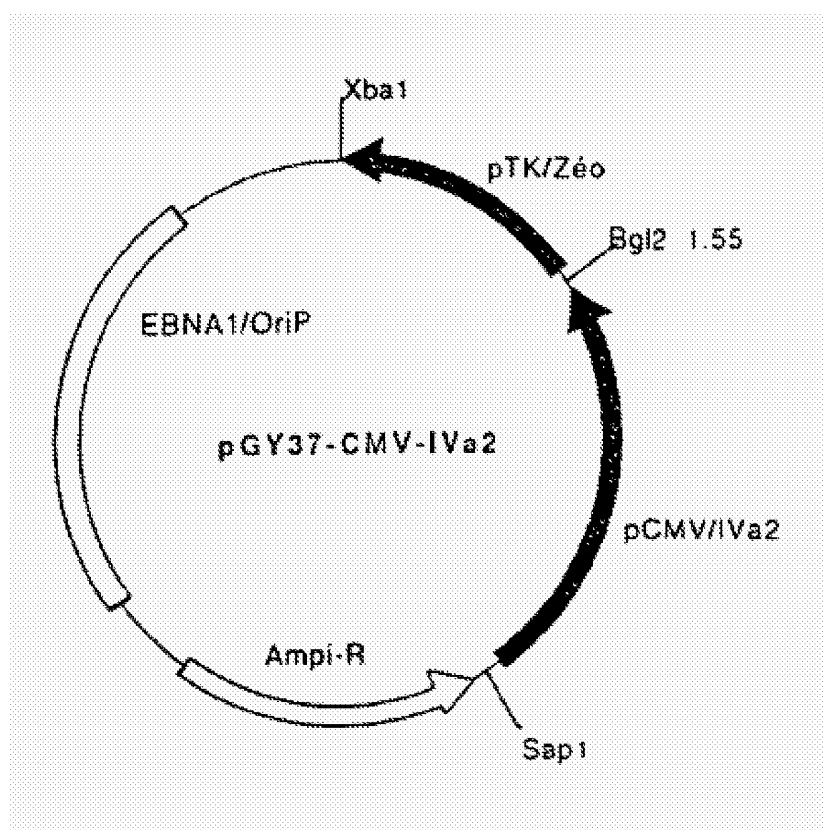


FIGURA 11

12/12

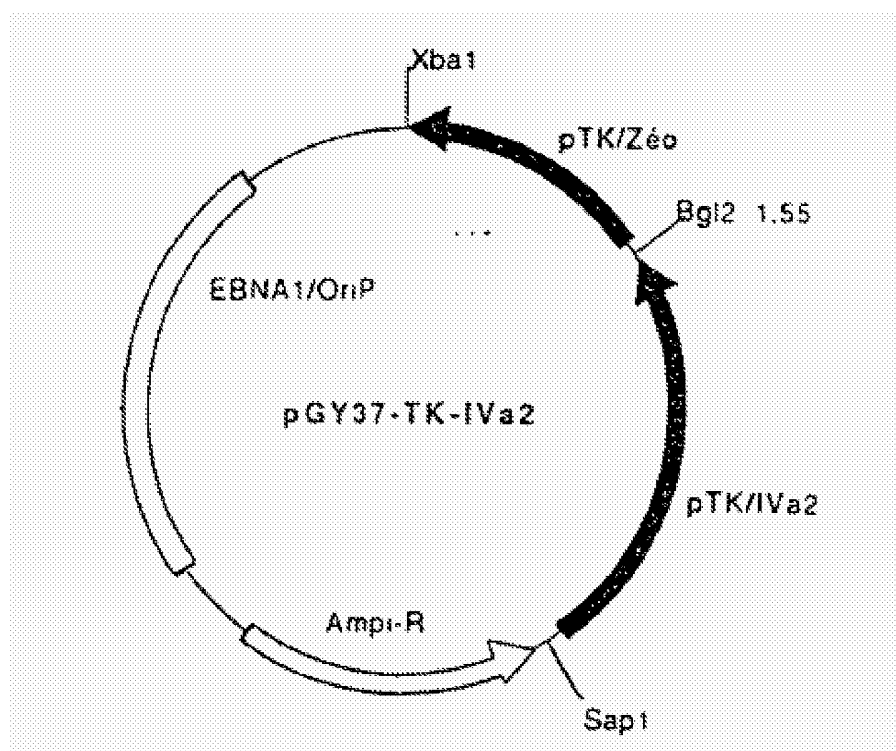


FIGURA 12