

(11) *Número de Publicação:* **PT 742834 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12N015/86 A C12N015/10 B
C12N007/00 B C12N007/01 B

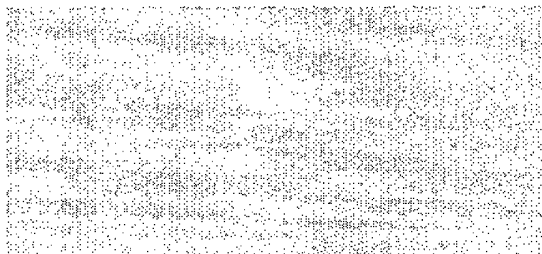
(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de depósito: 1995.12.01	(73) Titular(es): TRANSGENE S.A. 11, RUE DE MOLSHEIM F-67000 STRASBOURG FR
(30) Prioridade: 1994.12.01 FR 9414470	
(43) Data de publicação do pedido: 1996.11.20	(72) Inventor(es): CÉCILE CHARTIER FR ERIC DEGRYSE FR
(45) Data e BPI da concessão: 2000.09.20	(74) Mandatário(s): MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DO ARCO DA CONCEIÇÃO 3, 1º AND. 1100 LISBOA PT

(54) Epígrafe: PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM VECTOR VIRAL DE, PELO MENOS 20 KB POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA INTERMOLECULAR NUMA CÉLULA PROCARIOTA

(57) Resumo:

PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM VECTOR VIRAL DE, PELO MENOS 20 KB POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA INTERMOLECULAR NUMA CÉLULA PROCARIOTA



DESCRIÇÃO

**PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM VECTOR VIRAL DE, PELO MENOS, 20 KB
POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA INTERMOLECULAR NUMA CÉLULA
PROCARIOTA**

A invenção refere-se a um processo para preparar um vector viral *in vitro* numa célula procariota e a sua aplicação para produzir uma partícula viral infecciosa destinada a um uso terapêutico e, em particular, um uso em terapia génica.

A possibilidade de tratar as doenças humanas por terapia génica passou nalguns anos do estágio das considerações teóricas ao das aplicações clínicas. O primeiro protocolo aplicado ao homem iniciou-se nos Estados Unidos em Setembro de 1990 sobre um paciente geneticamente imunodeficiente devido a uma mutação afectando o gene codão para a Adenina Desaminase (ADA). O sucesso relativo desta primeira experiência encorajou o desenvolvimento de novos protocolos de terapia génica para diversas doenças genéticas ou adquiridas (doenças infecciosas e especialmente virais como o SIDA ou cancro). A grande maioria dos protocolos descritos até ao momento realizam vectores virais para transferir e exprimir o gene terapêutico nas células a tratar.

Hoje os vectores retrovirais estão entre os mais utilizados devido à simplicidade do seu genoma. No entanto, além da sua capacidade restrita de clonagem, apresentam dois inconvenientes importantes que limitam a sua utilização sistemática: por um lado, eles infectam maioritariamente as células em divisão e, por outro, devido à sua integração ao acaso no genoma da célula hospedeira, o risco de mutagenese insercional não é negligenciável. É por isso que numerosas equipas científicas se dedicaram a procurar outros tipos de vectores, entre os quais se podem citar os saídos dos adenovírus, vírus associados aos adenovírus (AAV), poxvírus e vírus do herpes. De um modo geral, a sua organização e o seu ciclo de infecção estão largamente descritos na literatura acessível ao homem da técnica.

A este respeito, o uso dos vectores adenovirais surgiu como uma alternativa prometedora. Os adenovírus foram evidenciados em numerosas espécies animais, têm um largo espectro de hospedeiro, são pouco patogénicos e não apresentam os inconvenientes ligados aos retrovírus já que se replicam nas células quiescentes e são não integrativos. A título indicativo, o seu genoma é constituído por uma molécula de ADN linear e bicatenária de cerca de 36 kb transportando mais de uma trintena de genes, simultaneamente genes

precoces necessários à replicação viral (E1 a E4) e genes tardios de estrutura (L1 a L5) (ver Figura 1).

De um modo geral, os vectores adenovirais obtêm-se por deleção de pelo menos uma parte dos genes virais (especialmente da região E1 essencial à replicação viral) que são substituídos pelos genes terapêuticos. Em consequência, eles são propagados numa linhagem celular, dita de complementação, que fornece *em trans* as funções virais deletadas para gerar uma partícula de vector viral defectiva para a replicação mas capaz de infectar uma célula hospedeira. Utiliza-se vulgarmente a linhagem 293, estabelecida a partir de células de rim embrionário humano, que complementa os adenovírus deletivos para a função E1 (Graham et al. , 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72).

As técnicas de preparação dos vectores adenovirais estão largamente descritas na literatura (ver nomeadamente Graham e Prevec, *Methods in Molecular Biology*, Vol 7; *Gene Transfer and Expression Protocols*; Ed: E.J. Murray, 1991, The Human Press Inc., Clinton, NJ). Um dos métodos mais conhecidos consiste em gerar o vector adenoviral recombinante nas células de complementação transfectadas com um plasmídeo bacteriano transportando o gene de interesse sub-clonado no seio da sua região de inserção adenoviral e o genoma adenoviral. Geralmente, este último é clivado por um enzima de restrição apropriado a fim de reduzir a infectividade do ADN viral parental e aumentar a eficácia do isolamento dos adenovírus recombinantes. No entanto, observa-se todavia um ruído de fundo importante de partículas virais infecciosas de origem parental, o que necessita de um trabalho de análise das colónias obtidas particularmente pesado (de um ponto de vista de tempo e custo já que cada colónia deve ser ampliada e analisada individualmente). Isto é problemático quando o vírus parental apresenta uma vantagem selectiva sobre o adenovírus recombinante, por exemplo quando este último se replica mais lentamente que o vírus parental, devido à inserção de um gene de interesse de grande dimensão (Factor VIII, distrofina), reduzindo outro tanto a sua possibilidade de obtenção.

A ligação entre dois fragmentos de ADN gerados pelas técnicas clássicas de biologia molecular e transportando respectivamente as partes 5' e 3' do vector adenoviral recombinante, pode igualmente ser utilizada. A transfecção da mistura de ligação nas células de complementação permite em teoria encapsidar (encapsider) o genoma do adenovírus recombinante para formar uma partícula infecciosa. Esta tecnologia é pouco

eficaz e a sua aplicação limitada pelo número restrito de locais de restrição apropriados e únicos.

Mostrou-se agora que é possível gerar em *Escherichia coli* (*E. coli*) um vector adenoviral recombinante homólogo intermolecular entre um plasmídeo contendo o genoma de um adenovírus de tipo 5 e uma inserção transportando uma sequência de ADN exógena rodeada de sequências adenovirais A e B (Figura 2). Este processo conduz à substituição no genoma adenoviral da região alvo situada entre A e B pela sequência exógena. A transfecção do vector adenoviral recombinante gerado desse modo numa linhagem de complementação adequada dá lugar a uma partícula viral infecciosa que pode ser utilizada sem etapa prévia de purificação para infectar uma célula hospedeira. O ruído de fundo (contaminação pelas partículas virais parentais) é reduzido ou mesmo suprimido. Além disso, descobriu-se de modo surpreendente que o uso de estirpes de *E. coli* recBC sbcBC é particularmente vantajoso para favorecer a recombinação intermolecular entre dois fragmentos quaisquer.

O processo da presente invenção baseia-se na exploração das actividades enzimáticas endógenas das células procariotas implicadas na recombinação homóloga. Esta técnica de recombinação homóloga intermolecular já tinha sido descrita para a clonagem de pequenas inserções nos vectores bacterianos (Bubeck et al., 1993, *Nucleic Acids Research*, 21, 3601-3602) ou para gerar por recombinação intermolecular genes híbridos (Calogero et al., 1992, *FEMS Microbiology Letters*, 97, 41-44; Caramori et al., 1991, *Gene*, 98, 37-44). No entanto esta tecnologia de recombinação nunca tinha sido realizada em células procariotas para gerar vectores virais infecciosos (capazes de ser encapsidados em partículas virais infecciosas).

O processo da invenção apresenta a vantagem sobre as técnicas anteriores de ser rápido, particularmente eficaz e de requer pouca manipulação *in vitro*. Além disso, pode ser realizado com fragmentos de ADN gerados por PCR (Polymerase Chain Reaction) evitando assim as etapas de sub-clonagem da sequência de ADN exógena na região de inserção do genoma viral. Por fim, traz uma solução vantajosa ao problema do ruído de fundo claramente identificado na literatura. Por consequência, ele afigura-se com um desempenho particularmente vantajoso para os vectores saídos de vírus de grande dimensão ou nos que se pretende inserir uma sequência de ADN exógena de grande dimensão.

É a razão pela qual a presente invenção tem por objectivo um processo para preparar, numa célula procariota, um vector vital recombinante de pelo menos 20 kb derivado de um vírus parental no genoma, do qual é inserida uma sequência de ADN exógena, por recombinação intermolecular entre (i) um primeiro fragmento de ADN compreendendo todo ou parte do referido genoma do vírus parental e (ii) um segundo fragmento de ADN compreendendo a referida sequência de ADN exógena rodeada de sequências flanqueantes A e B homólogas a (i).

Bubeck et al., *Nucleic Acids Research*, vol 21, nº 15, 25 de Julho de 1993, pp. 3601-3602: «Rapid cloning by homologous recombination in vivo», descrevem técnicas de clonagem permitindo obter plasmídeos recombinantes (vectores de clonagem) utilizáveis no âmbito das técnicas de biologia molecular e baseando-se nomeadamente na introdução dos referidos plasmídeos de fragmentos de ADN de pequenas dimensões (variando de 0,3 a 1,8 kb). Na mesma época, Oliver et al., *Nucleic Acids Research*, vol 21, 1993, pp. 5192-5197 publicavam trabalhos comparáveis e reconheciam que a eficácia da clonagem de fragmentos de ADN saídos da PCR era inversamente proporcional à dimensão dos referidos fragmentos.

A presente invenção afigura-se particularmente vantajosa quando se trata de preparar um vector viral recombinante de pelo menos 20 kb e, mais particularmente, de um vector tendo um genoma de um comprimento de 80 a 120% do do genoma do vírus selvagem correspondente, especialmente de 90 a 110% e, de preferência, de 95 a 105%.

No seio da presente invenção, obtém-se um vector viral recombinante a partir de um vírus parental modificado de modo a transportar num local apropriado do genoma viral e exprimir uma sequência de ADN exógena. Os vírus parentais susceptíveis de serem utilizados no quadro da presente invenção são, por exemplo, os alfavírus, os retrovírus, os poxvírus e especialmente os poxvírus da vacina ou o canaripox, os vírus do herpes, os vírus associados aos adenovírus (AAV) e muito particularmente os adenovírus.

A este respeito, a escolha do adenovírus parental é muito vasta. Pode tratar-se de um adenovírus de origem humana, canina, aviária, bovina, ovina, porcina ou simiana ou ainda de um adenovírus híbrido compreendendo fragmentos de genoma adenoviral de diferentes origens. Preferir-se-á muito particularmente um adenovírus de origem humana de serotipo C e, de preferência, um adenovírus de tipo 2 ou 5 ou ainda um adenovírus de

origem animal de tipo CAV-1 ou CAV-2 (canina), DAV (aviária) ou ainda BAd (bovina). Estes vírus e seu genoma estão descritos na literatura (ver por exemplo Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., 128, 171-176; Spibey e Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., 70, 165-172; Jouvenne et al., 1987, Gene, 60, 21-28; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., 76, 93-102).

Um processo de acordo com a invenção tem por objectivo a preparação de um vector viral recombinante para a transferência e a expressão de uma sequência de ADN exógena numa célula hospedeira. Por "sequência de ADN exógena", entende-se um ácido nucleico que compreendem sequências codões e sequências reguladoras que permitem a expressão das referidas sequências codões e nas quais as sequências codões são sequências que não estão normalmente presentes no genoma de um vírus parental em uso na presente invenção ou se elas o estão é num contexto genómico diferente. No âmbito da invenção, a sequência de ADN exógena pode ser constituída por um ou vários genes. As sequências reguladoras podem ter quaisquer origens.

De um modo preferido, a sequência de ADN exógena pode codificar para um ARN anti-sens e/ou um ARNm que será em seguida traduzido em proteína de interesse. Ela pode ser de tipo genómico, de tipo ADN complementar (ADNc) ou de tipo misto (minigene, no qual pelo menos um intrão é deletado). Ela pode codificar para uma proteína madura, um precursor de uma proteína madura, especialmente um precursor destinado a ser secretado e compreendendo por isso um péptido sinal, uma proteína quimérica proveniente da fusão de sequências de origens diversas ou um mutante de uma proteína natural apresentando as propriedades biológicas melhoradas ou modificadas. Esse mutante pode ser obtido por mutação, deleção, substituição e/ou adição de um ou vários nucleótidos(s) do gene codão para a proteína natural.

No âmbito da presente invenção pode ser vantajoso utilizar:

- os genes codões para as citocinas ou as linfocinas, como os interferões α , β e γ , as interleucinas e especialmente a IL-2, a IL-6 ou a IL-10, os factores necrosantes dos tumores (TNF) e os factores estimulantes de colónias (CSF);
- os genes codões para os receptores celulares, como os receptores reconhecidos por organismos patogénicos (vírus, bactérias ou parasitas), de preferência pelo

vírus VIH (Vírus da Imunodeficiência Humana) ou os ligandos de receptores celulares;

- os genes codãos para as hormonas de crescimento (HGF);
- os genes codãos para os factores de coagulação, como o factor VIII e o factor IX;
- o gene codão para a distrofina ou a minidistrofina;
- o gene codão para a insulina;
- os genes codãos para os polipéptidos intervindo directamente ou indirectamente nos canais iónicos celulares, como a proteína CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator);
- os genes codãos para os ARN anti-sens ou as proteínas capazes de inibir a actividade de uma proteína produzida por um gene patogénico, presente no genoma de um organismo patogénico, ou por um gene celular, cuja expressão é desregulada, por exemplo um oncogene;
- os genes codãos para um inibidor de protease como a α -1-anti-tripsina ou um inibidor de uma protease viral;
- os genes codãos para variantes de proteínas patogénicas que foram mutadas de modo a alterar a sua função biológica, como por exemplo variantes trans-dominantes da proteína TAT do vírus VIH capazes de competição com a proteína natural pela ligação à sequência alvo, impedindo assim a replicação do VIH;
- os genes codãos para epítopes antigénicos afim de aumentar a imunidade da célula hospedeiro;
- os genes codãos para os polipéptidos tendo propriedades anticancerosas e especialmente supressores de tumores como a proteína p53;

- os genes codãos para as proteínas do complexo mais importante de histocompatibilidade das classes I e II, bem como os genes codãos para as proteínas reguladoras da expressão desses genes;
- os genes codãos para as enzimas celulares ou produzidas pelos organismos patogénicos; e
- os genes suicidas. Pode citar-se mais particularmente o gene TK-HSV-1. A enzima TK viral apresenta uma afinidade claramente superior em relação à enzima TK celular para certos análogos de nucleósidos (como o aciclovir ou o ganciclovir). Ela converte-os em moléculas monofosfatadas, elas próprias convertíveis pelas enzimas celulares, em precursores de nucleótidos, que são tóxicos. Estes análogos de nucleótidos são incorporáveis nas moléculas de ADN por via de síntese, logo principalmente no ADN das células em estado de replicação. Esta incorporação permite destruir especificamente as células em divisão como as células cancerosas.
- os genes codãos para um anticorpo, um fragmento de anticorpo ou uma imunotoxina;
- os genes de transferência como o gene Lac-Z, codão para a β -galactosidade ou o gene luciferase.

Esta lista não é limitativa e claro que outros genes podem ser igualmente utilizados.

Por outro lado, uma sequência de ADN exógena usada na presente invenção pode além disso compreender um gene não terapêutico, por exemplo um gene codão para um marcador de selecção permitindo seleccionar ou identificar as células hospedeiras transfectadas. Pode citar-se o gene *neo* (codão para a neomicina fosfotransferase) conferindo uma resistência ao antibiótico G1418, o gene *dhfr* (Di-hidrofolato Redutase), o gene CAT (Clorofenicol Acetil Transferase), o gene *pac* (Puromicina Acetil-Transferase) ou ainda o gene *gpt* (Xantina Guanina Fosforibosil Transferase).

Claro que um gene usado na presente invenção pode ser colocado sob o controle de elementos apropriados à sua expressão numa célula hospedeira. Por "elementos

apropriados", entende-se o conjunto de elementos necessários à transcrição em ARN (ARN anti-sens ou ARNm) e à tradução de um ARNm em proteína. Entre os elementos necessários à transcrição, o promotor reveste-se de uma importância particular. Pode tratar-se de um promotor constitutivo ou de um promotor regulável e ele pode ser isolado de um gene qualquer de origem eucariota ou mesmo viral. Alternativamente, ele pode tratar-se do promotor natural do gene em questão. De um modo geral, um promotor usado na presente invenção, pode ser modificado de maneira a conter sequências reguladoras. A título de exemplos de promotores tecido-específicos, podem citar-se os dos genes imunoglobulinas quando se procura alvejar a expressão nas células hospedeiras linfocitárias e do gene α -1-antitripsina para uma expressão fígado-específica. Podem igualmente mencionar-se os promotores constitutivos do gene TK-HSV-1 (timidina quinase do vírus do herpes de tipo 1), do gene PGK (Fosfoglicerato quinase) murino ou humano, o promotor precoce do vírus SV40 (Simian Virus 40), um LTR retroviral ou ainda o promotor adenoviral MLP, especialmente do adenovírus humano de tipo 2.

O processo de acordo com a invenção utiliza um mecanismo de recombinação homólogo intermolecular. De um modo geral, consiste em trocar as sequências homólogas entre dois fragmentos de ADN. Estas sequências podem ser idênticas ou substancialmente homólogas. Noutros termos, o grau de homologia das sequências A e B com a parte correspondente do primeiro fragmento de ADN pode ser variável mas deve ser suficiente para permitir a recombinação molecular. Para os fins da presente invenção, é preferível que seja superior a 70%, com vantagem superior a 80%, de preferência superior a 90% e de modo de todo preferido próximo dos 100%. Mais, uma curta região de homologia pode ser suficiente (pelo menos 10 nucleótidos consecutivos comuns entre as sequências A e B e suas sequências homólogas no primeiro fragmento de ADN). No âmbito da presente invenção, o comprimento das sequências A e B está de preferência compreendido entre 10 pb e 10 kb, com vantagem 20 pb e 5 kb, de preferência 30 pb e 2 kb e, de modo de todo preferido, 10 pb e 1kb.

De acordo com um modo vantajoso, um processo de acordo com a invenção conduz à substituição do material genético localizado entre as sequências do primeiro fragmento de ADN homólogas às sequências A e B pela sequência exógena. Esta troca intermolecular permite gerar um vector viral recombinante circular sob forma de um vector procariota (plasmídeo, cosmídeo ou fago) permitindo a sua manipulação e/ou a sua propagação na

célula procariota. Um modo de realização do mecanismo utilizado no âmbito da presente invenção está ilustrado na Figura 2.

Embora a região de inserção da sequência exógena possa estar situada em qualquer posição do genoma viral, prefere-se evitar as regiões agindo *em cis* necessárias à replicação. Estas últimas compreendem especialmente as LTRs 5' e 3' bem como o sinal de encapsidação no caso dos retrovírus e as ITRs 5' e 3' e as região de encapsidação tratando-se dos adenovírus. Indica-se que a região de inserção pode ser dirigida em posições variadas em função das sequências homólogas A e B escolhidas.

Como indicado anteriormente, o primeiro fragmento de ADN compreende todo ou parte do genoma do vírus parental usado no âmbito da presente invenção. Pode tratar-se do genoma de um vírus selvagem ou do genoma de um vírus derivante modificado por deleção, adição e/ou substituição de um ou vários nucleótidos. Em particular, pode ser deletado de um ou vários genes na totalidade ou em parte.

O primeiro fragmento de ADN está de preferência incluído num vector convencional. A escolha deste é muito vasta, mas pode citar-se mais particularmente o pBR322, o p polyII ou ainda o p poly III*1 (Lathe et al., Gene, 57, 193-201). Segundo um modo de realização vantajoso do processo de acordo com a invenção, o primeiro fragmento de ADN está de preferência linearizado ao nível da região na qual se considera alvejar a inserção. Em particular, ele pode ser clivado por uma ou mais enzimas de restrição cujos locais estão localizados entre as sequências do primeiro fragmento de ADN homólogas às sequências A e B, mas igualmente ao nível destas últimas se bem que este modo de realização não seja preferido. A escolha dos locais de restrição a utilizar segundo o vírus parental retido está ao alcance do perito. Vantajosamente, preferir-se-á utilizar locais pouco representados no primeiro fragmento de ADN e em particular únicos. Além disso, esses locais podem igualmente ser criados pelas técnicas clássicas de mutagenese dirigida.

O segundo fragmento de ADN usado na presente invenção transporta especialmente a sequência de ADN exógena rodeada das sequências A e B implicadas na recombinação molecular. Prefere-se utilizar um fragmento de ADN linear. Ele pode ser gerado por PCR, excisado de um vector qualquer ou produzido por via sintética ou todo o método convencional no domínio da técnica. A título de exemplo, um segundo fragmento de ADN usado no âmbito da presente invenção pode ser obtido por amplificação da sequência de

ADN exógena a partir de um vector da técnica anterior ou de um banco genómico ou de um ADNc adequado com o auxílio de engodos apropriados munidos nas suas extremidades 5' de sequências A e B. Além disso, um segundo fragmento de ADN pode igualmente compreender sequências plasmídicas nas suas extremidades 5' e 3', que podem eventualmente ser utilizadas a título de sequências A e B na medida em que elas são homólogas às sequências plasmídicas contidas no primeiro fragmento de ADN.

Segundo um modo de realização particular, utiliza-se um processo de acordo com a invenção para a preparação de um vector viral recombinante defectivo para a replicação. Este termo designa um vector incapaz de acabar um ciclo infeccioso autónomo numa célula hospedeira. Geralmente, o genoma destes vectores defectivos é desprovido de um ou mais genes essenciais à replicação, genes precoces e/ou genes tardios. Eles podem ser deletados na totalidade ou em parte ou tornados não funcionais por mutação (adição, deleção e/ou substituição de um ou vários nucleótidos). A este respeito, um processo de acordo com a invenção pode permitir a preparação de um vector adenoviral recombinante desprovido de toda ou parte das regiões E1, E2, E3 e/ou E4.

A título ilustrativo, podem citar-se os modos de realização que se seguem. Quando se trata de preparar numa célula procariota um vector adenoviral recombinante derivando de um adenovírus humano de tipo 5 (Ad5) no qual se considera inserir uma sequência de ADN exógena no lugar da região E1, pode utilizar-se (i) um vector comportando um genoma do Ad5 clivado pela enzima *Cla*I (local de restrição situado na posição 918 do genoma AD5 tal como divulgado no banco de dados Genbank sob a referência M73260) e (ii) um fragmento de ADN compreendendo uma sequência A homóloga à região de encapsidação adenoviral, a sequência de ADN exógena seguida de uma sequência B homóloga à sequência codão para a proteína pIX. Além disso, o uso de um vector transportando um genoma adenoviral clivado pela enzima *Spe*I (posição 27082 do genoma Ad5) e de um fragmento de ADN compreendendo uma sequência A homóloga na extremidade 5' da região E2, a sequência de ADN exógena e uma sequência B homóloga na extremidade 3' da região E4 permitirá preparar um vector adenoviral recombinante no qual a sequência de ADN exógena é inserida no lugar da região E3. Claro que estes modos de realização particulares não são citados senão a título de exemplos. Por fim, o processo de acordo com a invenção pode ser utilizado para introduzir deleções, mutações e/ou substituições numa região particular de um genoma viral.

Segundo um outro modo de realização, um processo de acordo com a invenção pode igualmente ser utilizado para inserir pelo menos dois fragmentos de ADN no seio do genoma viral, por recombinação intermolecular entre (i) um primeiro fragmento de ADN compreendendo todo ou parte do referido genoma do vírus parental, (ii) um segundo fragmento de ADN compreendendo uma primeira parte da referida sequência de ADN exógena munida na sua extremidade 5' da referida sequência flanqueante A e (iii) um terceiro fragmento de ADN compreendendo uma segunda parte da referida sequência de ADN exógena munida na sua extremidade 3' da referida sequência flanqueante B; comportando os referidos segundos e terceiros fragmentos de ADN uma sequência homóloga recuperando-se nas suas extremidades 3' e 5' respectivas. A título indicativo, estas sequências homólogas entre os segundos e terceiros fragmentos de ADN correspondem aos mesmos critérios de homologia e de comprimento das sequências A e B. Este modo de realização específico é particularmente vantajoso para a clonagem das sequências exógenas de grande dimensão.

Um processo de acordo com a invenção pode ser realizado em qualquer célula procariota e especialmente numa bactéria derivada de uma estirpe de *Escherichia coli*. Mas, prefere-se muito particularmente utilizar uma estirpe recBC sbcBC, como por exemplo as estirpes CES200, CES201, W5449 e BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol., 166,557-580).

Um procedimento típico de um processo de acordo com a invenção compreende as etapas seguintes:

- (a) co-introduz-se, ou introduz-se de modo separado, numa célula procariota um primeiro fragmento de ADN e (ii) um segundo fragmento de ADN tais como definidos anteriormente,
- (b) cultiva-se a célula procariota obtida na etapa (a) em condições apropriadas para permitir a geração do vector viral recombinante por recombinação intermolecular, e
- (c) recupera-se o vector viral recombinante.

No âmbito de um processo de acordo com a invenção, as quantidades de primeiros e segundos fragmentos de ADN podem variar. Prefere-se utilizar uma concentração 10

vezes mais importante de segundo fragmento em relação ao primeiro. A introdução dos fragmentos de ADN numa célula procariota e a recuperação do vector destas mesmas células são realizadas segundo as técnicas clássicas de engenharia genética e de clonagem molecular detalhadas em Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

A presente invenção refere-se igualmente a um processo de preparar uma partícula viral infecciosa contendo um vector viral recombinante obtido utilizando um processo de acordo com a invenção, segundo o qual:

- (a) se introduz o referido vector viral recombinante numa célula de mamífero para gerar uma célula de mamífero transfectada,
- (b) se cultiva a referida célula de mamífero transfectada em condições apropriadas para permitir a produção da referida partícula viral, e
- (c) se recupera a referida partícula viral da cultura celular obtida na etapa (b).

As células podem ser transfectadas segundo técnicas padrão bem conhecidas do homem da técnica. Pode citar-se especialmente a técnica de fosfato de cálcio, a técnica de DEAE dextran, a electroporação, os métodos baseados nos choques osmóticos, a micro-injecção ou os métodos baseados na utilização de lipossomas. Segundo um modo de realização preferido, a célula mamífera é vantajosamente uma célula de complementação e especialmente uma célula 293 no âmbito de um vector derivando de um adenovírus. As partículas virais podem ser recuperadas do sobrenadante de cultura mas igualmente das células segundo protocolos convencionais.

A presente invenção cobre igualmente o uso de uma partícula viral infecciosa ou de um vector viral recombinante, preparado segundo um processo de acordo com a invenção, para o tratamento terapêutico ou cirúrgico do corpo humano e, especialmente, por terapia génica. Um processo de acordo com a invenção destina-se particularmente ao tratamento preventivo ou curativo de doenças tais como as doenças genéticas (hemofilia; talassemias, enfisema, doença de Gaucher, mucoviscidose, miopatia de Duchêne ou de Becker...), os cancros, as doenças virais (SIDA, infecções herpéticas ou devidas ao citomegalovírus ou ao papilomavírus). Para os fins da presente invenção, os vectores e

partículas virais preparados por um processo de acordo com a invenção podem ser introduzidos quer *in vitro* numa célula hospedeira retirada do paciente quer directamente *in vivo* no organismo a tratar. De preferência, a célula hospedeira é uma célula humana e, de modo preferido, uma célula pulmonar, fibroblástica, muscular, hepática, linfocitária ou uma célula da linhagem hematopoiética.

A presente invenção visa igualmente uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma partícula viral infecciosa ou de um vector viral recombinante, preparado segundo um processo de acordo com a invenção, em associação com um veículo aceitável do ponto de vista farmacêutico. Essa composição farmacêutica pode ser preparada segundo as técnicas de uso comum e administrada por qualquer via de administração conhecida, por exemplo por via sistémica (especialmente intravenosa, intratraqueal, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intratumoral ou intracraniana) ou por aerossolização ou instilação intrapulmonar.

Por fim, a presente invenção tem igualmente por objectivo o uso de uma partícula viral infecciosa ou de um vector viral recombinante, preparado segundo um processo de acordo com a invenção, para a expressão de uma sequência de ADN de interesse numa sistema celular.

A presente invenção é mais completamente descrita em referência às figuras que se seguem e com o auxílio dos exemplos que se seguem.

A Figura 1 é uma representação esquemática de um genoma do adenovírus humano de tipo 5 (representado em unidades arbitrárias de 0 a 100), indicando a substituição dos diferentes genes.

A Figura 2 ilustra um processo de recombinação intermolecular entre dois fragmentos de ADN. As sequências plasmídicas estão representadas por um traço fino, as sequências virais por um traço grosso e a sequência exógena por um rectângulo tracejado.

A Figura 3 é uma representação esquemática do vector pTG3614 correspondendo ao p polyII no qual está clonado o genoma de um adenovírus recombinante modificado na região E1 por inserção de uma cassete de expressão do gene FIX humano.

A Figura 4 é uma representação esquemática do vector pTG4652 correspondendo ao p polyII no qual está clonado o genoma de um adenovírus recombinante modificado nas regiões E1, E3 e E4 por inserção de uma cassete de expressão do gene CF humano e deleções parciais.

EXEMPLOS

Os exemplos seguintes ilustram apenas um modo de realização da presente invenção.

As construções descritas a seguir são realizadas segundo as técnicas gerais de engenharia genética e de biologia molecular detalhadas em Maniatis et al. (1989, *supra*). Os locais de restrição protuberantes em 5' podem ser convertidos em locais francos por tratamento pelo grande fragmento de Klenow do ADN polimerase de *E. coli* enquanto que os locais protuberantes em 3' são tratados pela T4 polimerase. No que diz respeito às etapas de amplificação por PCR, aplica-se o protocolo tal como é descrito em PCR Protocolos – A guide to methods and applications (1990, ed. Innis, Gelfand, Sninsky e White, Academic Press Inc.). As células são transfectadas pelos métodos convencionais e são cultivadas segundo as recomendações do fornecedor. Os fragmentos inseridos nas diferentes construções descritas a seguir são indicados precisamente segundo a sua posição no genoma do Ad5 tal como divulgada no banco de dados Genebank sob a referência M73260.

EXEMPLO 1: Construção de um vector viral recombinante derivado de um adenovírus humano de tipo 5 sob forma de um plasmídeo bacteriano

A. Clonagem do genoma de Adenovírus 5 (Ad5) no p polyII

Sintetiza-se a extremidade esquerda do genoma de Ad5 (nucleótidos 1 a 935) por PCR com o auxílio dos engodos oligonucleotídicos oTG6597 (SEQ ID NO: 1) e oTG6598 (SEQ ID NO: 2). A primeira hibrida-se aos 21 primeiros nucleótidos do ITR 5' e apresenta um local *PacI*, imediatamente a montante das sequências virais, e um local *EcoRI* utilizado para a clonagem. O segundo engodo permite a introdução dos locais *SalI*, depois *BglII* a jusante das sequências virais. A matriz envolvida nesta reacção é o ADN genómico de Ad5 preparado segundo os métodos convencionais. Digere-se o fragmento assim

amplificado por *EcoRI* e *BglII* e clona-se no plasmídeo p polyII (Lathe et al., 1987, *supra*) anteriormente clivado pelas suas duas enzimas de restrição para obter o pTG1692.

Prepara-se o fragmento de ADN correspondendo à extremidade do genoma de Ad5 (nucleótidos 35103 a 35935) seguindo o mesmo princípio, utilizando o par de oligonucleótidos oTG6599 (SEQ ID NO: 3) e oTG6597 (SEQ ID NO: 1). Constrói-se o pTG1693 inserindo o fragmento amplificado digerido por *EcoRI* e *BglII* nos mesmos locais de p polyII. Excisa-se de pTG1693 um fragmento *BglII*-*BamHI* transportando as sequências amplificadas de modo a introduzir no local *BglII* de pTG1692 a jusante das sequências 5' adenovirais. O pTG3601 assim obtido é linearizado entre as extremidades esquerda e direita do genoma de Ad5 por digestão com as enzimas de restrição *BglII* ou *SaII*. As extremidades assim geradas são tornadas francas pela acção do fragmento Klenow do ADN polimerase I de *E. coli*. As bactérias BJ5183 (Hanahan, 1983, *supra*) tornadas aptas para um tratamento com cloreto de cálcio são co-transformadas com a preparação precedente do ADN genómico de Ad5. As colónias obtidas são analisadas por cartografia de restrição. Selecciona-se um clone designado pTG3602 gerado por recombinação homóloga intermolecular no qual as sequências adenovirais (nucleótidos 936 a 35102) são inseridas entre os dois fragmentos produzidos por PCR, de modo a gerar um vector plasmídico compreendendo o genoma completo de Ad5 – pTG3602 é produzido nas bactérias C600 (Huynh et al., 1985 DNA clonning, Volume 1, ed. Glover, IRL Press Limited: Oxford, Inglaterra p.56-110).

B. Avaliação do poder infeccioso de pTG3602

Liberta-se o genoma viral por acção da enzima de restrição *PacI*. Transfectam-se células 293 cultivadas em monocamada com o produto desta digestão pela técnica de precipitação com fosfato de cálcio. Podem igualmente utilizar-se outras células sensíveis, por exemplo as células A549 (ATCC CCL185). Fazem-se crescer as células sob agar durante 9 a 14 dias, período durante o qual o surgimento de colónias de lise sobre o tapete celular testemunha a produção de partículas virais infecciosas e, portanto, a capacidade do genoma de Ad5 saído de pTG3602 se replicar.

C. Construção de um vector adenoviral recombinante defectivo no qual o gene exógeno substitui a região precoce E1.

Utiliza-se um plasmídeo no qual o gene de transferência Lac Z codão para a β -galactosidade é colocado num contexto viral; por exemplo um plasmídeo derivado do pMLP-Adk7 (Stratford-Perricaudet e Perricaudet, 1991, Human Gene Transfer, 219, 51-61) compreendendo as sequências 5' do Ad5 (nucleótidos 1 a 458), o promotor MLP Ad2, o gene Lac Z, o sinal de poliadenilação do vírus SV40 e as sequências Ad5 compreendidas entre os nucleótidos 3329 a 6241.

A cassette de expressão do gene Lac Z cingido de sequências adenovirais é excisada pela acção das enzimas de restrição *BsrGI* (posição 192 sobre o genoma de Ad5) e *PstI* (posição 3788), depois purificada. O pTG3602 é linearizado ao nível do local *ClaI* (posição 918), depois tratado com a klenow. Os dois fragmentos obtidos são co-transformados em bactérias BJ5183 aptas. Uma recombinação ao nível das sequências adenovirais homólogas conduz à substituição da região E1 de Ad5 (nucleótidos 459 a 3328) pela cassette de expressão do gene de transferência no plasmídeo pTG3603.

O seu poder infeccioso é verificado por transfecção de um tapete de células 293 transfectadas com pTG3603 anteriormente digerido por *PacI*. As colónias de lise formadas são então picadas e as partículas virais repostas em suspensão e utilizadas para infectar uma monocamada de células 293. A coloração das células a azul após adição de X-Gal testemunha a expressão do gene Lac-Z.

D. Construção de um vector adenoviral recombinante no qual o gene exógeno substitui a região precoce E3

Uma cassette de expressão do gene codão para a proteína gp19 da região E3 de Ad5 (nucleótidos 28731 a 29217) é reunida no bacteriófago M13mp18 (Gibco BRL) por clonagem de dois fragmentos PCR, um correspondendo ao LTR 3' de RSV (Rous Sarcoma Vírus) (engodos oligonucleotídicos oTG5892-SEQ ID NO: 4 e 5893-SEQ ID NO:5) e o outro à sequência codão para a gp19 (oTG5455-SEQ ID NO: 6 e 5456-SEQ ID NO:7). Obtém-se o vector M13TG1683, de onde se excisa a cassette de expressão por uma digestão *XbaI*. Após tratamento com a klenow, ele é introduzido no local *BsmI* (tornado franco por acção do ADN polimerase do fago T4) de pTG8519. Este derivado do plasmídeo puc19 (Gibco BRL), no qual se inseriram as sequências adenovirais compreendidas entre o local *SpeI* e a extremidade direita do genoma (nucleótidos 27082 a 35935) mas desprovidas da maioria da região E3 (nucleótidos 27871 a 30758). Obtém-se

o pTG1695 em que se substitui o fragmento *Scal-SpeI*, transportador das sequências plasmídicas, por um fragmento equivalente purificado de pTG1659. Este corresponde ao puc19 compreendendo as sequências do Ad5 prolongando-se dos nucleótidos 21562 a 35826. O pTG1697 assim obtido apresenta sequências adenovirais que se prolongam do local *BamHI* (posição 21562) ao ITR 3' (posição 35935) nas quais a região E3 é substituída por uma cassete de expressão da gp19 sob controle do promotor constitutivo RSV. O fragmento *DraI* (posição 22444 e 35142 sobre o genoma de Ad5) é purificado e co-introduzido nas bactérias BJ-5183 aptas com pTG3602 linearizado por *SpeI* e tratado pela klenow. Os recombinantes transportadores de um plasmídeo gerado por recombinação são examinados em relação à presença do promotor RSV. O pTG3605, vector plasmídico transportador do genoma de Ad-gp19+, é assim colocado em evidência.

Testa-se o poder infeccioso do genoma viral excisado do plasmídeo pTG3605 seguindo o protocolo já descrito anteriormente. A produção de uma proteína gp19 funcional é seguida por co-imunoprecipitação dos anti-genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 e desta (Burger e Kvist, 1985, Cell, 41, 987-997).

E. Construção de um vector adenoviral recombinante defectivo no qual as duas regiões precoces E1 e E3 são substituídas por genes exógenos

As células BJ-5183 são co-transformadas pelo fragmento *DraI* isolado de pTG1697 mencionado acima e pelo fragmento *SpeI* (Klenow) isolado de pTG3603. O plasmídeo resultante é testado nas mesmas condições que anteriormente.

F. Construção de um vector adenoviral recombinante exprimindo o gene FIX

O ADNc codão para o FIX humano foi clonado sob forma de um fragmento *BamHI* no plasmídeo pTG381. Neste último, a extremidade 5' não codão do gene FIX foi modificada de modo a estar conforme às regras de Kozak. O plasmídeo pTG381 está descrito na publicação da patente FR 2 600 334. O gene FIX é re-clonado no local *BamHI* de pTG6512 para dar pTG4375. O pTG6512 deriva do vector pTG6511 após deleção do promotor tardio principal (MLP) do Ad2 e substituição por um polilinker. A título indicativo, a construção do pTG6511 está detalhada no exemplo 1 do pedido internacional WO 94/28152. O promotor PGK murino é isolado pelos métodos convencionais a partir de ADN genómico de rato segundo Adra et al. (1987, Gene 60, 65-74) ou com o auxílio de

engodos adequados criados a partir dos dados de sequências divulgados no banco de dados Genbank sob a referência X15339. Incluem-se locais de restrição *Pst*I nas extremidades 5' dos engodos afim de facilitar as etapas de clonagem posteriores. O fragmento transportando o promotor PGK é tratado pela T4 polimerase, depois introduzido a montante do gene humano FIX no local *Hpa*I de pTG4375 de onde se excisa por digestão *Msc*I um fragmento dito "de substituição" comportando a cassette FIX rodeada de sequências adenovirais E1 (185 pb em 5' e 204 pb em 3').

Este é co-transformado em bactérias BJ5183 na presença do vector pTG3602 digerido por *Cla*I (posição 918). Os transformantes são seleccionados sobre ampicilina e analisados por cartografia de restrição. Retém-se o clone designado pTG3614 correspondendo a um vector adenoviral comportando o gene terapêutico FIX no lugar da região E1 (Figura 3). Constitui-se um stock viral de modo convencional, por transfecção do genoma adenoviral libertado por digestão *Pac*I na linhagem 293. Após uma etapa de amplificação, as células são lisadas e as partículas virais AdTG3614 purificadas por centrifugação sobre cloreto de cério.

A capacidade de transferir e exprimir o gene FIX é avaliada em modelo animal, rato. Para fazer isto, injectam-se $1,5 \times 10^9$ ufp na veia caudal de ratos fêmeas C57 Black 6 com idade de 5 a 6 semanas. Retiram-se amostras de sangue regularmente sobre as quais se doseia a quantidade de FIX humano por ELISA (Kit Diagnostica Stago, Asnières, França; Asserachirom[®] IX: Ag 00564). Detecta-se o FIX no soro de ratos durante várias semanas com um máximo de 5 dias.

G. Construção de um vector adenoviral modificado na região E2

Aquando do ciclo viral normal, a expressão dos genes da região E2 é induzida pelos produtos precoces de E1 e E4 e observa-se uma produção abundante das proteínas codificadas por E2 e, em particular, da proteína DBP (por DNA Binding Protein). Ora, esta expressão elevada pode ser problemática *in vivo* (indução de respostas inflamatórias ou interferência com a expressão do transgene). É por esta razão que foram construídos vectores adenovirais defectivos para a função E2A, quer por introdução de uma mutação termosensível em E2A (posição 22795; C em T resultando numa alteração Pro em Ser) quer por uma deleção parcial do gene DBP.

O vector pTG9551 transportando a mutação termosensível é gerado por recombinação homóloga das células BJ entre pTG3601 digerido por *Bgl*II e o ADN genómico purificado do vírus Ad5Hts (Ensinger e Ginsberg, 1972, J. Virol. 10, 328-339). O genoma assim reconstituído é libertado por digestão *Pac*I e transfectado nas células 293 que são incubadas a 32°C para a produção das partículas virais (a temperatura não permissiva é 39°C).

A defectuosidade de E2A pode igualmente ser gerada por deleção parcial das regiões codões do gene DBP evitando as regiões recobrimdo outros quadros de leitura. A construção é realizada por recombinação homóloga entre pTG3601 *Bgl*II e o ADN viral preparado a partir do vírus H5dl802 (Rice e Klessig, 1985, J. Virol 56, 767-778). Os vírus podem ser produzidos numa linhagem de complementação apropriada trans-complementando a função DBP, por exemplo a linhagem 293 transfectada por um vector permitindo a expressão constitutiva ou regulada do gene DBP.

H. Construção de um vector adenoviral modificado na região E4

Num primeiro momento, constrói-se um vector dito "de substituição" compreendendo uma cassette de expressão do gene codão para a proteína CFTR colocada no seio da região adenoviral E1. Este vector designado pTG8585 contém os elementos seguintes, todos descritos na literatura:

- o ITR 5' Ad5 (posições 1 a 458),
- o promotor MLP Ad2,
- o DNAc CFTR humano,
- o sinal de poliadenilação do gene da β -globina de coelho,
- o LTR 3' do vírus RSV (Rous Sarcoma virus),
- as sequências adenovirais codões para a proteína gp19 (posições 28731 a 29217 do Ad5), e
- a parte 3' da região E1B (posição 3329 a 6241).

Em paralelo, as sequências adenovirais recobrimdo as regiões E3 s E4 são sub-clonadas no vector p poly II e deletadas pelas técnicas clássicas de biologia molecular. Eliminam-se as sequências E3 (posições 28592 a 30470) por digestão *Xba*I e as sequências E4 (posições 32994 a 34998). O genoma adenoviral assim modificado é reconstituído por

recombinação homóloga entre um fragmento de substituição transportando estas modificações, isolado do vector precedente, e pTG3603 digerido por *SpeI*. Obtém-se pTG8595 transportando um genoma adenoviral recombinante (gene Lac Z no lugar da região E1) e defectivo para as funções E3 e E4.

As cassetes de expressão dos genes CFTR e gp19 indicadas acima são introduzidas em pTG8595 substituindo o gene Lac Z por co-transformação das células BJ5183 pelo fragmento *PacI* – *BstEII* isolado de pTG8585 e o vector pTG8595 linearizado por *ClaI*. Gera-se pTG4652 (Figura 4) que pode ser propagado numa linhagem celular complementando as funções E1 e E4 defectivas tais como as descritas no pedido internacional WO 94/28152.

As partícula virais são amplificadas, as células lisadas e os extractos celulares totais são analisados para a expressão do gene CFTR por Western blot (gel SDS-PAGE 8%). Incubam-se os filtros na presença de uma diluição a 1/5000 do anticorpo monoclonal MAB 1104 dirigido contra um péptido sintético correspondente aos aminoácidos 722 a 734 da proteína CFTR humana. Realiza-se a detecção pelo método ECL (Enhanced ChemiLuminescence; kit Amersham). Observam-se nos extractos celulares células infectadas por AdTG4652 uma banda de forte intensidade e bastante difusa correspondendo a um produto de peso molecular elevado co-migrando com uma testemunha CFTR. Esta banda não está presente nos extractos saídos do vírus parental pTG8585 que não contém a cassette de expressão CFTR.

EXEMPLO 2: Construção de um vector viral recombinante derivado do Adenovírus canino 2 (CAV2) sob forma de plasmídeo bacteriano

A. Clonagem do genoma de CAV2 no p poly II

O genoma CAV 2 é clonado no ppolyII *SfiI*-*NotI* 14 (Lathe et al., 1987, *supra*) e modificado para gerar vectores recombinantes utilizando os locais adequados seguindo os mesmos processos que os utilizados no caso da manipulação de Ad5. As extremidades esquerda (nucleótidos 1 a 810 seguindo a numeração da sequência D04368 de Genbank) e direita (nucleótidos ≈ 27600 até ao fim) são sintetizadas por PCR entre os pares de engodos oligonucleotídicos oTG6974 (SEQ ID NO: 8) e oTG6975 (SEQ ID NO: 9) e oTG6976 (SEQ ID NO: 10) e oTG6974, respectivamente. Elas são reunidas por intermédio do local *PstI*

introduzido aquando da PCR no seguimento das sequências virais, no caso da extremidade esquerda, e cartografada a aproximadamente 1200 pb do fim do genoma, no caso da extremidade direita. Bactérias aptas BJ5183 são co-transformadas com o plasmídeo assim obtido linearizado por *Pst*I e o ADN de CAV2. A introdução das sequências virais que faltam (nucleótidos 811 a 27600) realiza-se por recombinação homóloga. O genoma de CAV2 transportado pelo plasmídeo resultante é excisado por intermédio dos locais *Not*I introduzidos aquando da PCR, depois transfectado numa monocamada de células MDCK (ATCC CCL34). As etapas seguintes são descritas no exemplo 1.

B. Construção de um vector adenoviral recombinante de origem canina

O ADN genómico do vírus CAV2 (estirpe Toronto A 26/61; ATCC VR-800) é preparado pela técnica clássica (amplificação sobre linhagem renal de cão MDCK GHK..., lise das células, purificação dos vírus por centrifugação sobre cloreto de cézio, tratamento com proteinase K e, por fim, extracção com fenol / clorofórmio). O genoma CAV2, que tem um comprimento de 31 kpb, é introduzido num vector plasmídico por recombinação homóloga. Para fazer isso, isolam-se as extremidades esquerda e direita do genoma CAV2 por PCR e digestão enzimática, incorporando um local *Not*I imediatamente a seguir aos ITRs 5' e 3'. O vector pTG4457 é obtido por introdução no p poly II da parte 5' do genoma viral até ao local *Bst*BI (posição 870), seguido da parte 3' a partir do local *Sal*I (posição 27800). O genoma completo pode ser reconstituído por transformação entre o ADN genómico (100 a 500 ng) e pTG4457 digerido por *Bst*BI (10 a 100 ng). O genoma viral pode ser excisado do vector precedente pTG5406 por digestão *Not*I. Verifica-se que o ADN é infeccioso por transfecção de 1 a 5 µg nas células de cão MDCK ou GHK. Observa-se a produção de colónias.

O vector recombinante é obtido da seguinte maneira:

A extremidade esquerda do CAV2 é sub-clonada e modificada de modo a deletar as sequências codões E1A na totalidade e E1B parcialmente. Isto é efectuado por digestão *Nar*I, depois re-introdução de um fragmento amplificado por PCR recobrimdo a região de encapsidação, a região promotora E1A e o local de iniciação da transcrição. Os engodos são concebidos de modo a integrar igualmente um local de restrição único *Xba*I. Obtém-se pTG5407 no qual se introduz ao nível do local *Xba*I o gene CAT ou Lac Z (pTG5408).

Este último é digerido por *Xho*I e insere-se a parte 3' do genoma viral sob forma de um fragmento *Sal*I (posição 27800 até ao fim do ITR 3'). O vector pTG5409 assim obtido é linearizado por *all* e co-transformado em *E. coli* BJ5183 com o genoma CAV-2 digerido por *Sva*I. Obtém-se um vector adenoviral de origem canina transportando o gene de transferência CAT no lugar da região E1.

LISTA DAS SEQÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) DEPOSITANTE:

- (A) NOME: Transgene S.A.
- (B) RUA: 11 rue de Molsheim
- (C) CIDADE: Estrasburgo
- (D) PAÍS: França
- (E) CÓDIGO POSTAL: 67082
- (F) TELEFONE: (33) 88 27 91 00
- (G) TELECÓPIA: (33) 88 22 58 07

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Novo processo de preparação de um vector viral

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 10

(iv) FORMA LEGÍVEL POR COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE SUPORTE: Fita
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
- (C) SISTEMA DE EXPLORAÇÃO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatenIn Release # 1,0, Versão # 1,25 (OEB)

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: adenovírus humano

(B) ESTIRPE: serotipo 5

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG6597

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

GCCGAATTCT TAATTAACAT CATCAATAAT ATACCTTA

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: adenovírus humano

(B) ESTIRPE: serotipo 5

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG6598

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

GACACATCTG TCGACGTGGC AGGTAAGATC GATCA

INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

- (A) ORGANISMO: adenovírus humano
- (B) ESTIRPE: serotipo 5
- (C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG6599

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

AGGAGATCTG TCGACTCTCA AACATGTCTG CGGGT

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples
- (D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Rous sarcoma virus

(B) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG5892

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

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTG TGTTGGAGGT CGCTGAG

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: Rous sarcoma virus

(B) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG5893

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

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT GGTGAATGGT CAAATGG

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: adenovírus humano

(B) ESTIRPE: serotipo 5

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG5455

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

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: adenovírus humano

(B) ESTIRPE: serotipo 5

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG5456

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

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: adenovírus canino

(B) ESTIRPE: CAV-2

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG6974

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

CAGGGATCCG CGGCCGATC ATCAATAATA TACAGG

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 29 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: SIM

(iv) ORIGEM:

(A) ORGANISMO: adenovírus canino

(B) ESTIRPE: CAV-2

(C) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG6975

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

CTGCTGCAGT CAGAAATGCT AGCAGGAGA

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) NÚMERO DE RAMIFICAÇÕES: simples

(D) CONFIGURAÇÃO: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NÃO

(iii) ANTI-SENS: NÃO

(iv) ORIGEM:

(D) ORGANISMO: adenovírus canino

(E) ESTIRPE: CAV-2

(F) INDIVIDUAL ISOLADO: oligonucleótido de síntese OTG6976

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

TGCGGATCCA CAGACTAAGC GCAGGTA

Lisboa, 12 DEZ. 2000

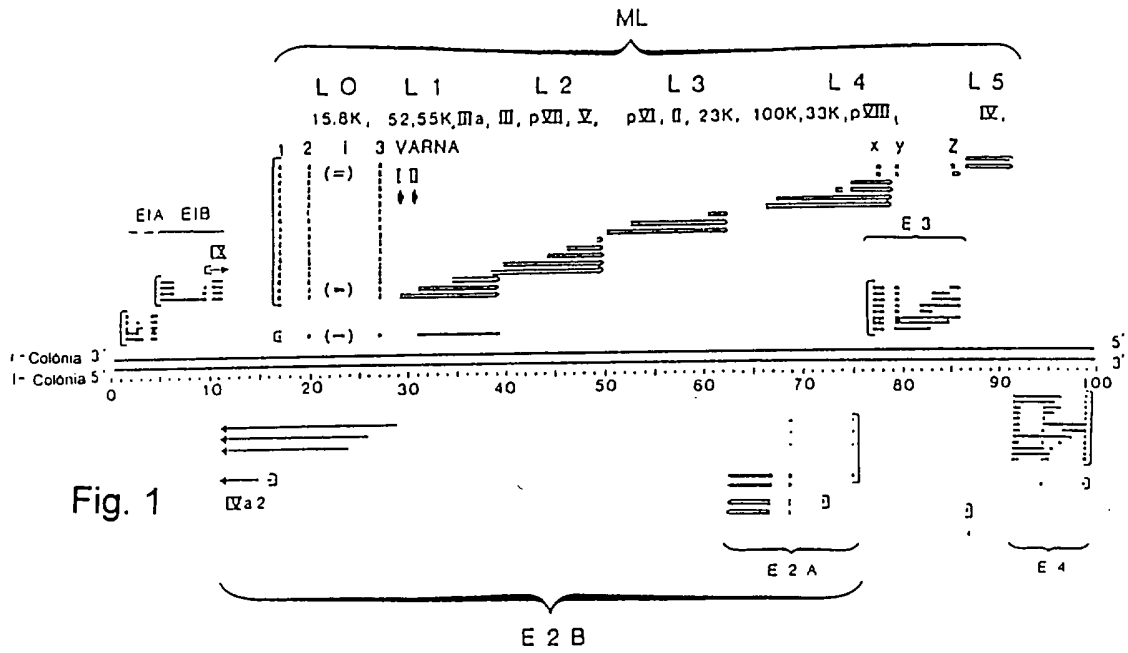
Por TRANSGENE S.A.



ENG.º MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA



2/4

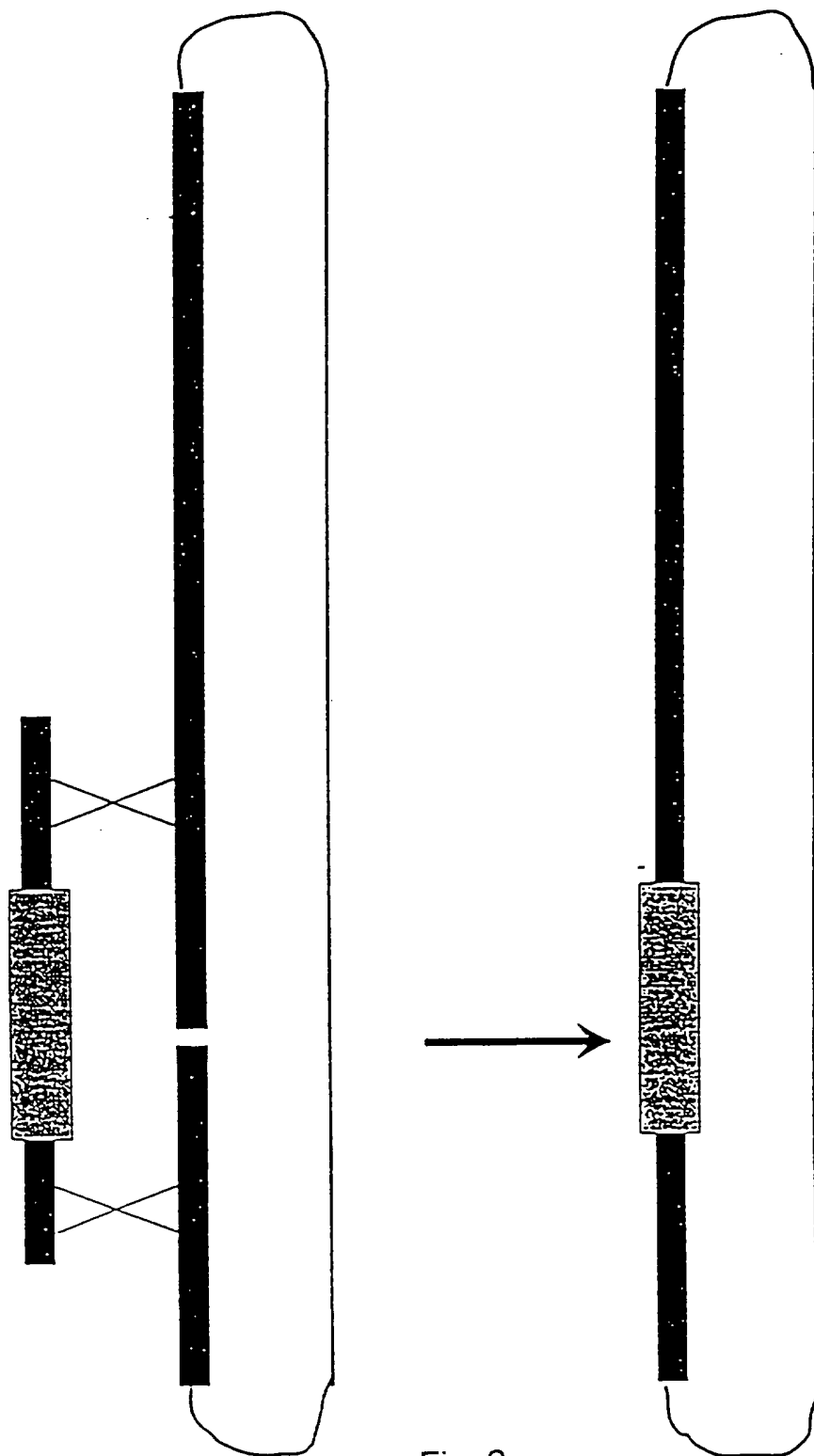


Fig. 2

3/4

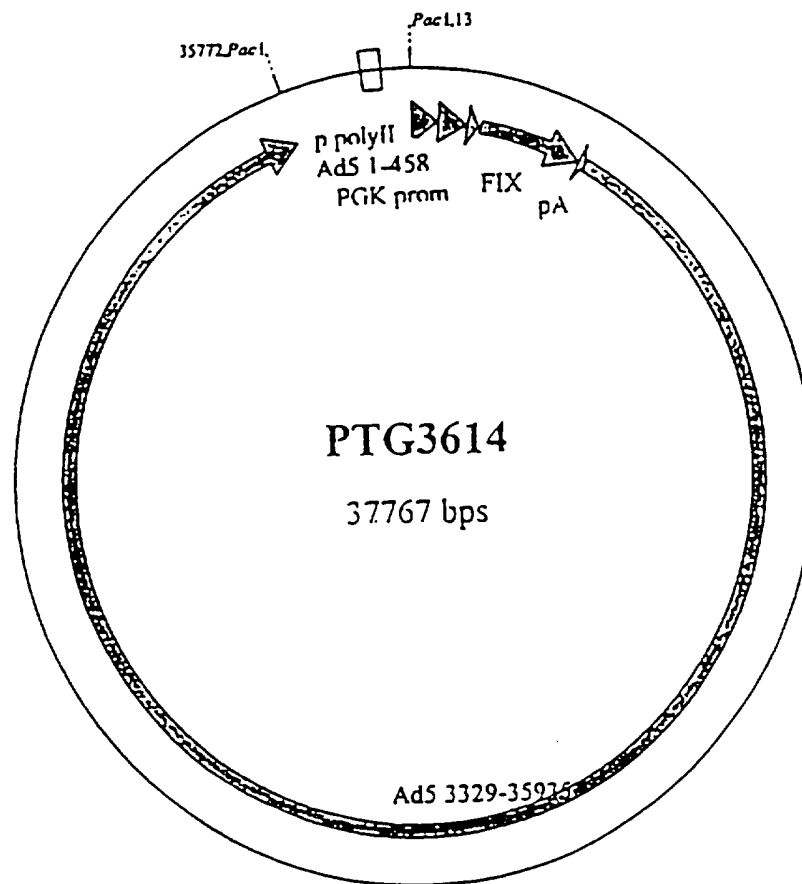


Fig. 3

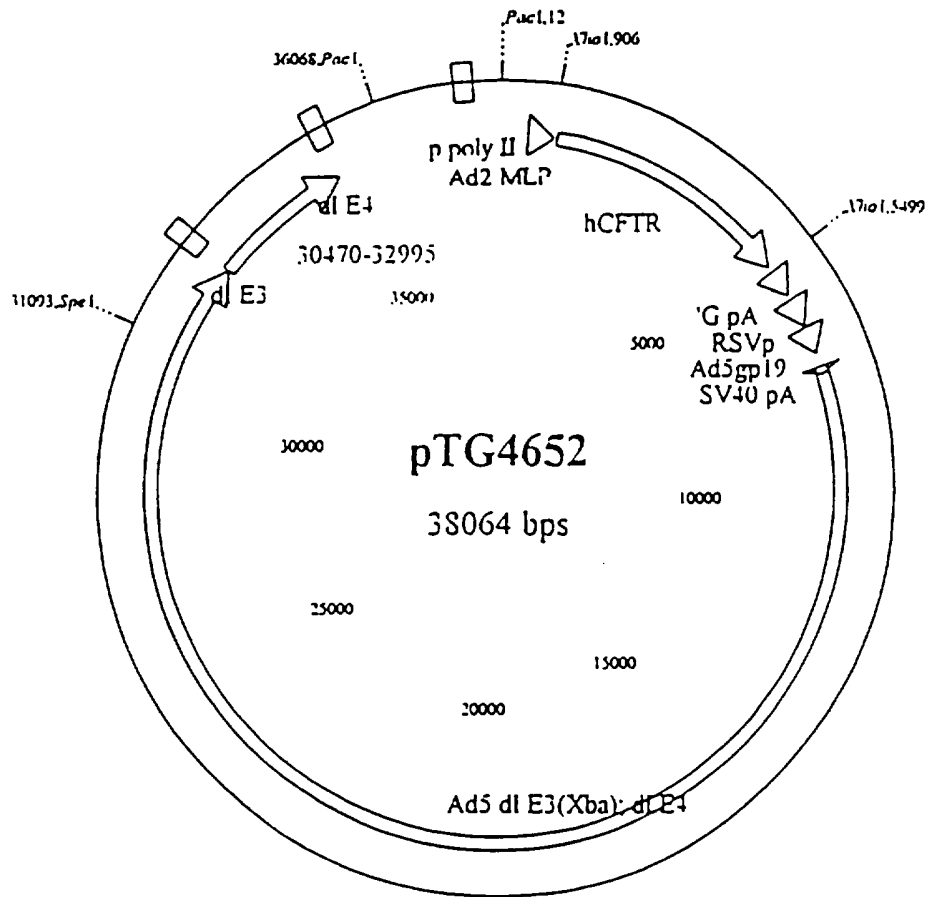


Fig. 4

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparar, numa célula procariota, um vector viral recombinante de pelo menos 20 kb derivado de um vírus parental no genoma do qual é inserida uma sequência de ADN exógena, por recombinação intermolecular entre (i) um primeiro fragmento de ADN compreendendo todo ou parte do referido genoma do vírus parental e (ii) um segundo fragmento de ADN compreendendo a referida sequência de ADN exógena rodeada de sequências flanqueantes A e B homólogas a (i).
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o vírus parental ser seleccionado entre o grupo constituído pelos adenovírus, os retrovírus, os vírus associados aos adenovírus, os poxvírus e os vírus do herpes.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o vírus parental ser um adenovírus de origem humana, canina, aviária, bovina, murina, ovina, porcina ou simiana ou ainda um adenovírus híbrido.
4. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o vírus parental ser um adenovírus de origem canina de tipo CAV-2.
5. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o vírus parental ser um adenovírus de origem humana de serotipo C.
6. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o vírus parental ser um adenovírus de origem humana de tipo 5.
7. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por a referida sequência de ADN exógena codificada por um polipéptido de interesse terapêuticamente seleccionado entre o grupo constituído pelos factores de coagulação, as hormonas de crescimento, as citoquinas, as linfoquinas, os polipéptidos supressores de tumores, os receptores celulares, os ligandos de receptores celulares, os inibidores de protease, os anticorpos, as toxinas, as imunotoxinas, a distrofina e os polipéptidos intervindo nos canais iónicos celulares tais como a proteína CFRT.
8. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por as sequências flanqueantes homólogas A e B terem um comprimento de 10 pb a 10 kb,

vantajosamente de 20 pb a 5 kb, de preferência de 30 pb a 2 kb e de modo de todo preferido de 40 pb a 1 kb.

9. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por o primeiro fragmento de ADN ser linearizado ao nível da região de inserção da sequência exógena.

10. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, para a preparação de um vector viral recombinante defectivo para a replicação.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, para a preparação de um vector viral recombinante desprovido de toda ou parte de pelo menos uma região essencial à replicação seleccionada entre as regiões E1, E2 e E3.

12. Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por o vector viral recombinante ser além disso desprovido de toda ou parte da região E3.

13. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, para a preparação de um vector viral recombinante de pelo menos 30 kb.

14. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, por recombinação intermolecular entre (i) um primeiro fragmento de ADN compreendendo toda ou parte do referido genoma do vírus parental, (ii) um segundo fragmento de ADN compreendendo uma primeira parte da referida sequência de ADN de interesse munida na sua extremidade 5' da referida sequência flanqueante A e (iii) um terceiro fragmento de ADN compreendendo uma segunda parte da referida sequência de ADN de interesse munida na sua extremidade 3' da referida sequência flanqueante B; comportando os referidos segundo e terceiro fragmento de ADN uma sequência homóloga nas suas extremidades 3' e 5', respectivas.

15. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 14, para introduzir uma modificação por deleção, mutação e/ou substituição de um ou vários nucleótidos ou uma sequência de ADN exógena num genoma viral.

16. Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado por a referida célula procariota ser derivada de uma estirpe de *Escherichia coli* recBC sbcBC.

17. Processo para preparar uma partícula viral infecciosa contendo um vector viral recombinante obtido utilizando um processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 16, segundo o qual:

(a) se introduz o referido vector viral recombinante numa célula de mamífero para gerar uma célula de mamífero transfectada,

(b) se cultiva a referida célula de mamífero transfectada em condições apropriadas para permitir a produção da referida partícula viral, e

(c) se recupera a referida partícula da cultura celular obtida na etapa (b).

18. Uso de uma estirpe de *E. coli* recBC sbcBC para a clonagem de fragmentos de ADN num vector de acordo com a reivindicação 1 para recombinação homóloga intermolecular.

Lisboa, 12 DEZ. 2000

Por TRANSGENE S.A.



ENG.º MANUEL MONIZ PEREIRA

Agente Oficial da Propriedade Industrial

Arco da Conceição, 3, 1.º - 1100 LISBOA

RESUMO

PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE UM VECTOR VIRAL DE, PELO MENOS, 20 KB POR RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA INTERMOLECULAR NUMA CÉLULA PROCARIOTA

A invenção refere-se a um processo para preparar, numa célula procariota, um vector viral recombinante por recombinação homóloga intermolecular, a um processo para preparar uma partícula viral infecciosa contendo esse vector, bem como a uma composição farmacêutica que os compreende. A invenção cobre igualmente o seu uso terapêutico, especialmente no quadro da terapia génica aplicada ao homem.