



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 231 813**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/861**  
**C12N 5/10**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96917735 .1**

⑧⑥ Fecha de presentación: **14.06.1996**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0833934**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.1998**

⑤④ Título: **Sistemas de empaquetado para adenovirus recombinante en el hombre destinado a la terapia génica.**

③⑩ Prioridad: **15.06.1995 EP 95201611**  
**26.06.1995 EP 95201728**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2005**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2005**

⑦③ Titular/es: **Crucell Holland B.V.**  
**Archimedesweg, 4**  
**2333 CN Leiden, NL**

⑦② Inventor/es: **Fallaux, Frits, Jacobus;**  
**Hoeben, Robert, Cornelis;**  
**Bout, Abraham;**  
**Valerio, Domenico y**  
**Van der Eb, Alex, Jan**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 231 813 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

# ES 2 231 813 T3

## DESCRIPCIÓN

Sistemas de empaquetado para adenovirus recombinante en el hombre destinado a la terapia génica.

5 La invención se refiere al campo de la tecnología del ADN recombinante, más concretamente al campo de la terapia génica. En particular la invención se refiere a la terapia génica en la que se utilizan materiales derivados de adenovirus, en particular adenovirus recombinante humano. Especialmente se refiere a vectores derivados de virus novedosos y líneas celulares de empaquetamiento novedosas para vectores basados en adenovirus.

10 La terapia génica es un concepto desarrollado recientemente para el cual se pueden y se han ideado una amplia gama de aplicaciones.

En la terapia génica se introduce una molécula que porta información genética en algunas o todas las células de un huésped, como resultado de lo cual se añade información genética al huésped en un formato funcional.

15 La información genética añadida puede ser un gen o un derivado de un gen, tal como un ADNc, que codifica una proteína. En este caso el formato funcional significa que la proteína puede ser expresada por la maquinaria de la célula huésped.

20 La información genética también puede ser una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos (ya sea ADN o ARN) presente en la célula huésped. El formato funcional en este caso consiste en que la molécula de ADN (ácido nucleico) añadida o las copias realizadas de la misma *in situ* sean capaces de emparejar las bases con la secuencia complementaria presente en la célula huésped.

25 Entre las aplicaciones se incluyen el tratamiento de las alteraciones genéticas suplementando una proteína u otra sustancia que, debido a dicha alteración genética, no se encuentra presente o al menos está presente en cantidades insuficientes en el huésped, el tratamiento de tumores y (otras) enfermedades adquiridas tales como las enfermedades (auto)inmunes o infecciones, etc.

30 Como puede resultar evidente a partir de lo anterior, existen básicamente tres enfoques diferentes en terapia génica, uno dirigido a compensar una deficiencia presente en un huésped (mamífero); el segundo dirigido a la separación o eliminación de sustancias no deseadas (organismos o células) y el tercero a la aplicación de una vacuna recombinante (tumores o microorganismos foráneos).

35 Para el propósito de la terapia génica, se han propuesto como vehículos adecuados adenovirus que portan delecciones. Los adenovirus son virus con ADN sin envuelta. Los vectores de transferencia génica derivados de adenovirus (denominados vectores virales) tienen numerosos rasgos que los hacen particularmente útiles para la transferencia génica con tales fines. Por ejemplo, la biología de los adenovirus está caracterizada con detalle, el adenovirus no está asociado a patologías humanas graves, el virus es extremadamente eficaz al introducir su ADN en la célula huésped, el virus puede infectar una amplia variedad de células y tiene una amplia gama de huéspedes, el virus puede ser producido en grandes cantidades con relativa facilidad, y el virus se puede volver de replicación deficiente mediante delecciones en la región temprana 1 (E1) de genoma viral.

45 El genoma de los adenovirus es una molécula de ADN de doble hebra lineal de aproximadamente 36.000 pares de bases con la proteína terminal de 55 kDa unida covalentemente al extremo 5' de cada hebra. El ADN de Ad contiene Repeticiones Terminales Invertidas (ITR) idénticas de aproximadamente 100 pares de bases dependiendo de la longitud exacta del serotipo. Los orígenes de replicación virales están localizados en las ITR exactamente en los extremos del genoma. La síntesis de ADN se produce en dos fases. Primero, la replicación se desarrolla mediante desplazamiento de la hebra, generando una molécula dúplex hija y una hebra desplazada parental. La hebra desplazada es de hebra sencilla y puede formar un intermedio denominado "panhandle", que permite el inicio de la replicación y la generación de una molécula dúplex hija. Alternativamente, la replicación puede desarrollarse desde ambos extremos del genoma simultáneamente, obviando el requerimiento de formar la estructura "panhandle". La replicación se resume en la Figura 14 adaptada de (Lechner and Kelly, 1977).

55 Durante el ciclo de infección productivo, los genes virales son expresados en dos fases: la fase temprana, que es el período hasta la replicación del ADN viral, y la fase tardía, que coincide con el inicio de la replicación del ADN viral. Durante la fase temprana sólo se expresan los productos génicos tempranos, codificados por las regiones E1, E2, E3 y E4, que portan numerosas funciones que preparan la célula para la síntesis de las proteínas estructurales virales (Berk, 1986). Durante la fase tardía se expresan los productos génicos virales tardíos además de los productos génicos tempranos y se disparan la síntesis de ADN y de proteínas de la célula huésped. Por consiguiente, la célula se dedica a la producción de ADN viral y de proteínas estructurales virales (Tooze, 1981).

65 La región E1 del adenovirus es la primera región del adenovirus expresada después de la infección de la célula diana. Esta región consta de dos unidades transcripcionales, los genes E1A y E1B, ambos requeridos para la transformación oncogénica de cultivos de roedor primarios (embrionarios). Las principales funciones de los productos génicos E1A son:

i) inducir a las células quiescentes a entrar en el ciclo celular y reanudar la síntesis de ADN celular, y

## ES 2 231 813 T3

ii) activar transcripcionalmente el gen E1B y las otras regiones tempranas (E2, E3, E4). La transfección de las células primarias con el gen E1A solo puede inducir una proliferación ilimitada (inmortalización), pero no da como resultado una transformación completa. Sin embargo, la expresión de E1A en la mayoría de los casos da como resultado la inducción de la muerte celular programada (apoptosis), y sólo ocasionalmente se obtiene la inmortalización (Jochemsen y col., 1987). La co-expresión del gen E1B es requerida para evitar la inducción de la apoptosis y para hacer que se produzca la transformación morfológica completa. En líneas celulares inmortales establecidas, un elevado nivel de expresión de E1A puede causar la transformación completa en ausencia de E1B (Roberts y col., 1985).

Las proteínas codificadas por E1B ayudan a E1A a redirigir las funciones celulares para permitir la replicación viral. Las proteínas E1B de 55 kD y E4 de 33 kD, que forman un complejo que se localiza esencialmente en el núcleo, funcionan inhibiendo la síntesis de las proteínas del huésped y facilitando la expresión de los genes virales. Su principal influencia consiste en establecer un transporte selectivo de ARNm virales desde el núcleo hasta el citoplasma, simultáneamente al comienzo de la fase tardía de la infección. La proteína E1B de 21 kD es importante para corregir el control temporal del ciclo de infección productivo, evitando de ese modo la muerte prematura de la célula huésped antes de que el ciclo vital del virus se haya completado. Los virus mutantes incapaces de expresar el producto génico E1B de 21 kD manifiesta un ciclo de infección acortado que está acompañado de una degradación excesiva del ADN cromosómico de la célula huésped (fenotipo *deg*) y un efecto citopático intensificado (fenotipo *cyt*) (Telling y col., 1994). Los fenotipos *deg* y *cyt* son suprimidos cuando además el gen E1A es mutado, indicando que estos fenotipos son una función de E1A (White y col., 1988). Además, la proteína E1B de 21 kDa disminuye la velocidad mediante la cual E1A pone en marcha los otros genes virales. No se sabe todavía a través de qué mecanismo E1B de 21 kD sofoca estas funciones dependientes de E1A.

Los vectores derivados de adenovirus humanos, en los que al menos la región E1 ha sido suprimida y remplazada por un gen de interés, han sido extensamente utilizados para experimentos de terapia génica en fase pre-clínica y clínica.

Como se ha establecido antes, todos los vectores de adenovirus utilizados en la actualidad en terapia génica tienen una delección en la región E1, donde se puede introducir información genética novedosa. La delección de E1 vuelve al virus recombinante de replicación deficiente (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991). Los autores de la presente invención han demostrado que los adenovirus recombinantes son capaces transferir eficazmente genes recombinantes al hígado de rata y al epitelio de las vías respiratorias de monos rhesus (Bout y col., 1994b; Bout y col., 1994a). Además, los autores de la presente invención (Vincent y col., 1996a; Vincent y col., 1996b) y otros (ver, v.g., Haddada y col., 1993) han observado una transferencia génica mediada por adenovirus *in vivo* muy eficaz a una variedad de células tumorales *in vitro* y a tumores sólidos en modelos animales (tumores de pulmón, glioma) y xenoinjertos humanos en ratones inmunodeficientes (pulmón) *in vivo* (revisado por Blaese y col., 1995).

En contraste por ejemplo con los retrovirus, los adenovirus a) no se integran en el genoma de la célula huésped; b) son capaces de infectar células que no están en división y c) son capaces de transferir eficazmente genes recombinantes *in vivo* (Brody and Crystal, 1994). Esos rasgos hacen de los adenovirus atractivos candidatos para la transferencia génica *in vivo*, por ejemplo, de genes suicidas o citoquinas a células tumorales.

No obstante, un problema asociado con la tecnología de adenovirus recombinante actual es la posibilidad de generación no deseada de adenovirus de replicación competente (ARC) durante la producción de adenovirus recombinante (Lochmüller y col., 1994; Imler y col., 1996). Esta está causada por la recombinación homóloga entre secuencias solapantes del vector recombinante y los constructos del vector presentes en la línea celular complementadora, tales como las células 293 (Graham y col., 1977). El ARC en los lotes que se van a utilizar en pruebas clínicas no es deseable debido a que el ARC i) replicará de una manera descontrolada; ii) puede complementar los adenovirus recombinantes de replicación deficiente, causando una multiplicación descontrolada de los adenovirus recombinantes y iii) los lotes que contienen ARC inducen una lesión tisular significativa y por tanto fuertes efectos secundarios patológicos (Lochmüller y col., 1994). Por lo tanto, se debe probar primero que los lotes que van a ser utilizados en pruebas clínicas están libres de ARC (Ostrove, 1994). En un aspecto de la invención se resuelve este problema de la producción de virus ya que los autores de la presente invención han desarrollado células de empaquetamiento que no tienen secuencias solapantes con un nuevo vector básico y por tanto son adecuadas para la producción segura a gran escala de adenovirus recombinantes. Uno de los problemas adicionales asociados con el uso de vectores de adenovirus recombinantes es la reacción de defensa del huésped frente al tratamiento con adenovirus.

En resumen, los adenovirus recombinantes son sometidos a la delección de la región E1 (ver arriba). Los productos de E1 de adenovirus desencadenan la transcripción de los otros genes tempranos (E2, E3, E4), que por consiguiente activan la expresión de los genes tardíos del virus. Por lo tanto, generalmente se pensaba que los vectores con E1 suprimida no expresarían ningún otro gen del adenovirus. No obstante, recientemente se ha demostrado que algunos tipos de células son capaces de expresar genes de adenovirus en ausencia de las secuencias de E1. Esto indica, que algunos tipos de células poseen la maquinaria para conducir la transcripción de los genes de adenovirus. En particular, se demostró que tales células sintetizan E2A y las proteínas tardías del adenovirus.

En el marco de la terapia génica, esto significa que la transferencia del gen recombinante terapéutico a células somáticas no sólo produce la expresión de la proteína terapéutica sino que también produce la síntesis de proteínas virales. Las células que expresan las proteínas adenovirales son reconocidas y eliminadas por los Linfocitos T Cito-tóxicos, que de este modo, a) erradican las células transducidas y b) ocasionan inflamaciones (Bout y col., 1994a;

## ES 2 231 813 T3

Engelhardt y col., 1993; Simon y col. 1993). Como esta reacción adversa está impidiendo la terapia génica, se han sugerido numerosas soluciones a este problema, tales como a) utilización de agentes inmunosupresores después del tratamiento; b) conservación de la región E3 del adenovirus en el vector recombinante (ver la solicitud de patente EP 0.707.071) y c) utilización de mutantes ts de adenovirus humanos, que tienen un punto de mutación en la región E2A (patente WO 94/28938).

No obstante, estas estrategias para salvar la respuesta inmune tienen sus limitaciones.

El uso de los adenovirus recombinantes mutantes ts disminuye la respuesta inmune en cierto grado, pero era menos eficaz al prevenir las respuestas patológicas en los pulmones (Engelhardt y col., 1994a).

La proteína E2A puede inducir una respuesta inmune por sí misma y juega un papel fundamental en la puesta en marcha de la síntesis de proteínas de adenovirus tardías. Por lo tanto, es atractivo elaborar adenovirus recombinantes que tienen mutaciones en la región E2, haciéndolos sensibles a la temperatura (ts), como se ha reivindicado en la solicitud de patente WO 94/28938.

La principal desventaja de este sistema es el hecho de que, aunque la proteína E2 es inestable a la temperatura no permisiva, la proteína inmunogénica todavía está siendo sintetizada. Además, es de esperar que la proteína inestable active la expresión del gen tardío, aunque en un grado bajo. Los adenovirus recombinantes mutantes ts125 han sido sometidos a ensayo, y se ha informado de una expresión génica recombinante prolongada (Yang y col., 1994b; Engelhardt y col., 1994a; Engelhardt y col., 1994b; Yang y col., 1995). Sin embargo, la patología en los pulmones de ratas Cotton todavía era elevada (Engelhardt y col., 1994a), indicando que el uso de los mutantes ts sólo produce una mejora parcial de la tecnología de los adenovirus recombinantes. Otros (Fang y col., 1996) no observaron una expresión génica prolongada en ratones ni en perros utilizando adenovirus recombinantes ts125. Una dificultad adicional asociada con el uso de adenovirus mutantes es que se observa una elevada frecuencia de reversión. Estos revertientes son o bien revertientes reales o bien el resultado de segundas mutaciones en el sitio (Kruijer y col., 1983; Nicolas y col., 1981). Ambos tipos de revertientes tienen una proteína E2A que funciona a la temperatura normal y por lo tanto tienen una toxicidad similar a la del virus de tipo salvaje.

En otro aspecto de la presente invención los autores de la presente invención suprimen por lo tanto las secuencias codificadoras de E2A del genoma del adenovirus recombinante y transfectan estas secuencias E2A a las líneas celulares (de empaquetamiento) que contienen las secuencias E1 para complementar los vectores de adenovirus recombinantes.

Los principales obstáculos de este enfoque son a) que E2A debe ser expresada a niveles muy elevados y b) que la proteína E2A es muy tóxica para las células.

La presente invención describe por lo tanto en otro aspecto el uso del gen E2A mutante ts125, que produce una proteína que no es susceptible de unirse a secuencias de ADN a la temperatura no permisiva. Se pueden mantener elevados niveles de esta proteína en las células (debido a que no es tóxica a esta temperatura) hasta que se realiza la puesta en marcha a la temperatura permisiva. Esto se puede combinar colocando el gen E2A mutante bajo la dirección de un promotor inducible, tal como por ejemplo el promotor inducible por esteroides tet, el de la metalotioneína, el del receptor  $\beta$  de ácido retinoico u otros sistemas inducibles. Sin embargo en otro aspecto más de la invención, se describe el uso de un promotor inducible para controlar el momento de producción de E2A salvaje tóxica.

Dos notables ventajas adicionales del adenovirus recombinante con E2A suprimido son el incremento de la capacidad para albergar secuencias heterólogas y la selección permanente de células que expresan la E2A mutante. Esta segunda ventaja se refiere a la elevada frecuencia de reversión de la mutación ts125: cuando se produce la reversión en una línea celular que alberga E2A ts125, ésta será letal para la célula. Por lo tanto, existe una selección permanente para aquellas células que expresan la proteína E2A mutante ts125. Además, como los autores de la presente invención en un aspecto de la presente invención generan adenovirus recombinantes con E2A suprimido, no tendrán el problema de la reversión en sus adenovirus.

En otro aspecto de la invención se describe como una mejora adicional el uso de líneas celulares no humanas como líneas celulares de empaquetamiento.

Para la producción de GMP de lotes clínicos de virus recombinantes es deseable utilizar una línea celular que haya sido ampliamente utilizada para la producción de otros productos de biotecnología. La mayoría de las líneas celulares más recientes tienen su origen en el mono, que ha sido utilizado para producir v.g. vacunas. Estas células no pueden ser utilizadas directamente para la producción de adenovirus humano recombinante, ya que el adenovirus humano no puede replicar o sólo lo puede a bajos niveles en células con origen de mono. Un obstáculo en el cambio de la fase temprana a tardía del ciclo lítico del adenovirus es la replicación deficiente subyacente. No obstante, se describen mutaciones de la gama de huésped en el genoma del adenovirus humano (hr400 - 404) que permiten la replicación de virus humanos en células de mono. Estas mutaciones residen en el gen que codifica la proteína E2A (Klessig and Grodzicker, 1979; Klessig y col., 1984; Rice and Klessig, 1985) (Klessig y col., 1984). Por otra parte, se han descrito virus mutantes que albergan el fenotipo tanto hr como ts125 sensible a la temperatura (Brough y col., 1985; Rice and Klessig, 1985).

## ES 2 231 813 T3

Por lo tanto los autores de la presente invención generan líneas celulares de empaquetamiento con origen en células de mono (v.g., VERO, CV1) que albergan:

- a. secuencias E1, para permitir la replicación de adenovirus carentes de E1/E2, y
- b. secuencias E2A, que contienen la mutación hr y la mutación ts 125, denominados ts400 (Brough y col., 1985; Rice and Klessig, 1985) para evitar la muerte celular por sobreexpresión de E2A, y/o
- c. secuencias E2A, que contienen sólo la mutación hr, bajo el control de un promotor inducible, y/o
- d. secuencias E2A, que contienen la mutación hr y la mutación ts 125 (ts400), bajo el control de un promotor inducible.

Además los autores de la presente invención describen la construcción de combinaciones novedosas y mejoradas de líneas celulares de empaquetamiento (novedosas y mejoradas) y vectores de adenovirus recombinantes (novedosos y mejorados). Los autores de la presente invención proporcionan:

1. una línea celular de empaquetamiento novedosa derivada de retinoblastos embrionarios humanos diploides (HER) que alberga los nt. 80 - 5.788 del genoma de Ad5. Esta línea celular, denominada 911, consignada bajo el núm. 95062101 en la ECACC, tiene muchas características que la hacen superior a las células 293 utilizadas comúnmente (Fallaux y col., 1996).
2. líneas celulares de empaquetamiento que expresan sólo los genes E1A y no los genes E1B. Las líneas celulares establecidas (y las células diploides no humanas de las cuales derivan las células 293 y 911) son capaces de expresar E1A a elevados niveles sin experimentar muerte celular apoptótica, como ocurre en las células diploides humanas que expresan E1A en ausencia de E1B. Tales líneas celulares son capaces de complementar in trans los adenovirus recombinantes carentes de E1B, debido a que los virus mutados para la proteína E1B de 21 kD son capaces de completar la replicación viral incluso más rápido que los adenovirus de tipo salvaje (Telling y col., 1994). Los constructos se describen con detalle más abajo, y se representan gráficamente en las Figuras 1-5. Los constructos son transfectados en las diferentes líneas celulares establecidas y son seleccionados por la elevada expresión de E1A. Esto se realiza conectando operativamente un gen marcador seleccionable (v.g. gen NEO) directamente al promotor E1B. El promotor E1B está activado transcripcionalmente por el producto génico E1A y por lo tanto la resistencia al agente selectivo (v.g. se utiliza G418 en el caso de NEO como marcador de selección) produce la selección directa para la expresión deseada del gen E1A.
3. Los constructos de empaquetamiento en los que la E1B de 21 kD ha sido mutada o suprimida, pero sólo expresan la proteína de 55 kD.
4. Los constructos de empaquetamiento que se van a utilizar para la generación de líneas celulares de empaquetamiento complementadoras de células diploides (no exclusivamente de origen humano) sin necesidad de selección con genes marcadores. Estas células son inmortalizadas mediante la expresión de E1A. Sin embargo, en este caso concreto es esencial la expresión de E1B para evitar la apoptosis inducida por las proteínas E1A. La selección de las células que expresan E1 se logra mediante la selección en cuanto a la formación de focos (inmortalización), como se describe para las células 293 (Graham y col., 1977) y las células 911 (Fallaux y col., 1996), que células de riñón embrionario humano (HEK) y retinoblastos embrionarios humanos (HER) transformados con E1, respectivamente.
5. Tras la transfección de las células HER con el constructo pIG.E1A.E1B (Fig. 4), se pudieron establecer siete líneas celulares independientes. Estas líneas celulares fueron denominadas PER.C1, PER.C3, PER.C4, PER.C5, PER.C6, PER.C8 y PER.C9. PER indica PGK-E1-Retinoblastos. Estas líneas celulares expresan las proteínas E1A y E1B, son estables (v.g. PER.C6 durante más de 57 pases) y complementan los vectores de adenovirus carentes de E1. Los rendimientos de adenovirus recombinante obtenidos en las células PER son algo superiores a los obtenidos en las células 293. Una de estas líneas celulares (PER.C6) ha sido consignada en la ECACC con el número 96022940.
6. Nuevos vectores de adenovirus con deleciones de E1 ampliadas (delección nt. 459 - 3.510). Esos vectores virales carecen de secuencias homólogas a las secuencias de E1 en dichas líneas celulares de empaquetamiento. Estos vectores adenovirales contienen secuencias promotoras pIX y el gen pIX, ya que pIX (de sus secuencias promotoras naturales) sólo puede ser expresado a partir del vector y no por las células de empaquetamiento (Matsui y col., 1986, Hoeben and Fallaux, pers. Comm: Imler y col., 1996).
7. Las líneas celulares de empaquetamiento que expresan E2A basadas preferiblemente en líneas celulares establecidas que expresan E1A o células diploides que expresan E1A + E1B (ver en 2 - 4). La expresión de E2A o bien está bajo el control de un promotor inducible o bien el mutante ts125 E2A es dirigido por un promotor inducible o constitutivo.

## ES 2 231 813 T3

8. Vectores de adenovirus recombinantes como se ha descrito antes (ver 6) pero que portan una delección adicional de las secuencias E2A.
9. Células de empaquetamiento de adenovirus con origen de mono que son capaces de complementar en trans adenovirus recombinantes carentes de E1.

Preferiblemente estas son transfectadas simultáneamente con pIG.E1AE1B y pIG.NEO, y seleccionadas en cuanto a la resistencia a NEO. Tales células que expresan E1A y E1B son susceptibles de complementar en trans adenovirus humanos recombinantes carentes de E1, pero lo harán ineficazmente debido al bloqueo de la síntesis de proteínas tardías de adenovirus en células con origen de mono (Klessig and Grodzicker, 1979). Para superar este problema, los autores de la presente invención generan adenovirus recombinantes que albergan una mutación de la gama de huésped en el gen E2A, permitiendo que los adenovirus humanos repliquen en células de mono. Tales virus son generados como se describe en la Figura 12, excepto que se utiliza ADN de un mutante hr para la recombinación homóloga.

10. Células de empaquetamiento de adenovirus con origen de mono como se describe en 9, excepto que también serán transfectadas simultáneamente con secuencias de E2A que albergan la mutación hr. Esto permite la replicación de adenovirus humanos que carecen de E1 y E2A (ver 8). En estas líneas celulares E2A o bien está bajo el control de un promotor inducible o bien se utiliza el mutante tsE2A. En el último caso, el gen E2A portará tanto la mutación ts como la mutación hr (derivada de ts400). Se han descrito adenovirus humanos de replicación competente que albergan ambas mutaciones (Brough y col., 1985; Rice and Klessig, 1985).

Un aspecto adicional de la invención proporciona vectores de adenovirus mejorados de otro modo, así como estrategias novedosas para la generación y aplicación de tales vectores y un método para la amplificación intracelular de fragmentos de ADN lineal en células de mamífero.

Los denominados vectores de adenovirus “mínimos” según la presente invención conservan al menos una porción del genoma viral que es requerida para la encapsidación del genoma en las partículas del virus (la señal de encapsidación), así como al menos una copia de al menos una parte funcional o un derivado de la Repetición Terminal Invertida (ITR), esto es secuencias de ADN derivadas de los extremos del genoma del adenovirus lineal. Los vectores según la presente invención también contendrán un transgen conectado a una secuencia promotora para dirigir la expresión del transgen. El empaquetamiento del denominado vector de adenovirus mínimo se puede lograr mediante infección simultánea con un virus coadyuvante o, alternativamente, con un sistema coadyuvante de replicación deficiente como se describe más abajo.

Los fragmentos de ADN derivado de adenovirus que pueden replicar en líneas celulares adecuadas y que pueden servir como sistema coadyuvante de replicación deficiente empaquetador son generados como sigue. Estos fragmentos de ADN conservan al menos una porción de la región transcrita de la unidad de transcripción “tardía” del genoma del adenovirus y portan delecciones al menos en una porción de la región E1 y delecciones en al menos una porción de la señal de encapsidación. Además, estos fragmentos de ADN contienen al menos una copia de una repetición terminal invertida (ITR). En un extremo de la molécula de ADN transfectada está localizada la ITR. El otro extremo puede contener una ITR, o alternativamente, una secuencia de ADN que sea complementaria a una porción de la misma hebra de la molécula de ADN distinta de la ITR. Si, en último caso, las dos secuencias complementarias se recuecen, el grupo 3'-hidroxilo libre del nucleótido 3' terminal de la estructura en horquilla puede servir como cebador para la síntesis de ADN mediante ADN polimerasas celulares y/o codificadas por adenovirus, dando como resultado la conversión en una forma de doble hebra o al menos una porción de la molécula de ADN. La replicación adicional que se inicia en la ITR dará como resultado una molécula de ADN de doble hebra lineal, que está flanqueada por dos ITR, y es más grande que la molécula de ADN transfectada original (ver la Fig. 13). Esta molécula puede replicar por sí misma en la célula transfectada en virtud de las proteínas de adenovirus codificadas por la molécula de ADN y las proteínas adenovirales y celulares codificadas por los genes en el genoma de la célula huésped. Esta molécula de ADN no puede ser encapsidada debido a su gran tamaño (mayor de 39.000 pares de bases) o debido a la ausencia de una señal de encapsidación funcional. Se pretende que esta molécula de ADN sirva como coadyuvante para la producción de vectores de adenovirus incompletos.

La invención también comprende un método para la amplificación de fragmentos de ADN lineales de tamaño variable en células de mamífero adecuadas. Estos fragmentos de ADN contienen al menos una copia de la ITR en un extremo del fragmento. El otro extremo puede contener una ITR, o alternativamente, una secuencia de ADN que es complementaria a una porción de la misma hebra de la molécula de ADN distinta de la ITR. Si, en último caso, las dos secuencias complementarias se recuecen, el grupo 3'-hidroxilo libre del nucleótido 3' terminal de la estructura en horquilla puede servir como cebador para la síntesis de ADN mediante las ADN polimerasas celulares y/o codificadas por adenovirus, dando como resultado la conversión de la hebra desplazada en una forma de doble hebra de al menos una porción de la molécula de ADN. Adicionalmente la replicación que se inicia en la ITR dará como resultado una molécula de ADN de doble hebra lineal, que está flanqueada por dos ITR, que es más grande que la molécula de ADN transfectada original. Una molécula de ADN que contiene secuencias ITR en ambos extremos puede replicar por sí misma en células transfectadas en virtud de la presencia de al menos las proteínas E2 de adenovirus (a saber la proteína de unión a ADN (DBP), la ADN polimerasa de adenovirus (Ad-pol), y la proteína pre-terminal (pTP). Las proteínas requeridas pueden ser expresadas a partir de genes de adenovirus en la propia molécula de ADN, a partir de

## ES 2 231 813 T3

los genes E2 de adenovirus integrados en el genoma de la célula huésped, o a partir de un fragmento coadyuvante para la replicación como se ha descrito antes.

Varios grupos han demostrado que la presencia de secuencias ITR en el extremo de las moléculas de ADN es suficiente para generar minicromosomas de adenovirus que pueden replicar, si se proporcionan en trans las proteínas de adenovirus requeridas para la replicación v.g. mediante infección con un virus coadyuvante (Hu y col., 1992); (Wang and Pearson, 1985); (Hay y col., 1984). Hu y col., (1992) observaron la presencia y la replicación de dímeros de minicromosomas de adenovirus simétricos tras la transfección de plásmidos que contenían una única ITR. Los autores fueron capaces de demostrar que estos minicromosomas diméricos se originaban tras la ligadura cola-a-cola de las moléculas de ADN de una sola ITR. En el ADN extraído de partículas de tipo 2 de adenovirus incompletos, también se han observado moléculas diméricas de diversos tamaños utilizando la microscopía electrónica (Daniell, 1976). Se sugirió que los genomas incompletos se formaban mediante recombinación ilegítima entre diferentes moléculas y que las variaciones en la posición de la secuencia en la cual se producía el emparejamiento de bases ilegítimo eran responsables de la naturaleza heterogénea de los genomas incompletos. Basándose en este mecanismo se especuló que, en teoría, se podrían generar moléculas anormales con una longitud total de hasta dos veces la del genoma normal. Tales moléculas podrían contener secuencias duplicadas de cualquier extremo del genoma. Sin embargo, no se encontraron moléculas de ADN más grandes que el virus en toda su longitud empaquetadas en las partículas anormales (Daniell, 1976). Esto puede ser explicado mediante las limitaciones de tamaño que se aplican al empaquetamiento. Además, se observó que en las partículas de virus las moléculas de ADN con un extremo izquierdo duplicado predominaban sobre aquellas que contenían el extremo derecho (Daniell, 1976). Esto se explica completamente mediante la presencia de la señal de encapsidación cerca del extremo izquierdo del genoma (Gräble and Hearing, 1990; Gräble and Hearing, 1992; Hearing y col., 1987).

Los principales problemas asociados con los vectores derivados de adenovirus actuales son:

A) La fuerte inmunogenicidad de la partícula de virus

B) La expresión de los genes del adenovirus que reside en los vectores adenovirales, dando como resultado una respuesta de las células T citotóxicas frente a las células transducidas.

C) La baja cantidad de secuencias heterólogas que pueden ser acomodadas en los vectores actuales (Hasta aproximadamente un máximo de 8.000 pb de ADN heterólogo).

Información sobre A). La fuerte inmunogenicidad de las partículas de adenovirus produce una respuesta inmunológica del huésped, incluso después de la administración del vector adenoviral. Como resultado del desarrollo de los anticuerpos neutralizantes, una posterior administración del virus será menos eficaz o incluso completamente ineficaz. Sin embargo, una expresión prolongada o persistente de los genes transferidos reducirá el número de administraciones requeridas y puede evitar el problema.

Información sobre B). Los experimentos realizados por Wilson y colaboradores han demostrado que después de la transferencia génica mediada por adenovirus a animales inmunocompetentes, la expresión del transgen disminuye gradualmente y desaparece aproximadamente 2 - 4 semanas después de la infección (Yang y col., 1994a; Yang y col., 1994b). Esto está causado por el desarrollo de una respuesta de las Células T Citotóxicas (CTL) frente a las células transducidas. Las CTL fueron dirigidas contra proteínas de adenovirus expresadas por los vectores virales. En la síntesis por las células transducidas de la proteína de unión al ADN de adenovirus (el producto del gen E2A), se pudieron establecer proteínas pentónicas y de la fibra (productos génicos tardíos). Estas proteínas de adenovirus, codificadas por el vector viral, fueron expresadas a pesar de la delección de la región E1. Esto demuestra que la delección de la región E1 no es suficiente para evitar completamente la expresión de los genes virales (Engelhardt y col., 1994a).

Información sobre C). Los estudios de Graham y colaboradores han demostrado que los adenovirus son capaces de encapsidar ADN de un tamaño de hasta un 105% el del genoma normal (Bett y col., 1993). Los genomas más grandes tienden a ser inestables dando como resultado la pérdida de secuencias de ADN durante la propagación del virus. Combinando delecciones en las regiones E1 y E3 del genoma viral aumenta el tamaño máximo del foráneo que puede ser encapsidado hasta aproximadamente 8,3 kb. Además, algunas secuencias de la región E4 parecen ser innecesarias para el crecimiento del virus (añadiendo otras 1,8 kb a la capacidad máxima de encapsidación). Asimismo la región E2A puede ser suprimida del vector, cuando el producto del gen E2A es proporcionado en trans en la línea celular de encapsidación, añadiendo otras 1,6 kb. No obstante, es improbable que la capacidad máxima del ADN foráneo puede ser incrementada significativamente más allá de 12 kb.

Los autores de la presente invención desarrollaron una nueva estrategia para la generación y producción de provisiones de partida libres de coadyuvante de vectores de adenovirus recombinantes que puedan alojar hasta 38 kb de ADN foráneo. Sólo se necesita que dos secuencias ITR funcionales, y secuencias que puedan funcionar como señal de encapsidación formen parte del genoma vector. Tales vectores son denominados adenovectores mínimos. Las funciones del coadyuvante para los adenovectores mínimos son proporcionadas en trans por las moléculas de ADN de replicación competente y encapsidación deficiente que contienen todos los genes virales que codifican los productos génicos requeridos, con la excepción de aquellos genes que están presentes en el genoma de la célula huésped, o los genes que residen en el genoma del vector.

## ES 2 231 813 T3

Las aplicaciones de las invenciones descritas son esbozadas más abajo y se ilustrarán en la parte experimental, que sólo está destinada a este fin, y no se debe utilizar para reducir el alcance de la presente invención como comprenderá una persona experta en la técnica.

### 5 *Uso de constructos de empaquetamiento de IG para Células diploides*

Los constructos, en particular pIG.E1A.E1B, se utilizarán para transfectar células humanas diploides, tales como Retinoblastos Embriónicos Humanos (HER), células de Riñón Embriónico Humano (HEK), y células de Pulmón Embriónico Humano (HEL). Las células transfectadas serán seleccionadas por el fenotipo transformado (formación de foco) y sometidas a ensayo en cuanto a su capacidad para soportar la propagación de adenovirus recombinantes con E1 suprimida, tal como IG.Ad.MLPI.TK. Tales líneas celulares se utilizarán para la generación y producción (a gran escala) de adenovirus recombinantes con E1 suprimida. Tales células, infectadas con adenovirus recombinante también están destinadas a ser utilizadas *in vivo* en forma de un productor local de adenovirus recombinante, v.g. para el tratamiento de tumores sólidos.

Se utilizan células 911 para la titulación, generación y producción de vectores de adenovirus recombinantes (Fallaux y col., 1996).

Las células HER transfectadas con pIG.E1A.E1B han dado como resultado 7 clones independientes (células denominadas PER). Estos clones se utilizan para la producción de vectores de adenovirus con E1 suprimida (incluyendo vectores de adenovirus no solapantes) o con E1 defectuosa y proporcionan la base para la introducción v.g. de constructos E2B o E2A (v.g. ts125E2A, ver más abajo), E4, etc., que permitirán la propagación de vectores de adenovirus que tengan mutaciones v.g. E2A o E4.

Además, con estos constructos se inmortalizarán células diploides de otras especies que sean permisivas para el adenovirus humano, tales como ratas Cotton (*Sigmodon hispidus*) (Pacini y col., 1984), hámster Sirio (Morin y col., 1987) o chimpancé (Levrero y col., 1991). Tales células, infectadas con adenovirus recombinante, también están destinadas a ser utilizadas *in vivo* para la producción local de adenovirus recombinante, v.g. para el tratamiento de tumores sólidos.

### 30 *Células establecidas*

Los constructos, en particular pIG.E1A.NEO, pueden ser utilizados para transfectar células establecidas, v.g., A549 (carcinoma bronquial humano), KB (carcinoma oral), MRC-5 (línea celular de pulmón diploide humano) o líneas celulares GLC (cáncer de pulmón de células pequeñas) (de Leij y col., 1985; Postmus y col., 1988) y seleccionados en cuanto a su resistencia a NEO. Las colonias individuales de células resistentes son asiladas y sometidas a ensayo en cuanto a su capacidad para soportar la propagación de adenovirus recombinante con E1 suprimida, tales como IG.Ad.MLPI.TK. Cuando la propagación de los virus con E1 suprimida sobre células que contienen E1A es posible, tales células pueden ser utilizadas para la generación y producción de un adenovirus recombinante con E1 suprimida. También son utilizadas para la propagación del adenovirus recombinante con E1A suprimida/E1B conservada.

Las células establecidas también pueden ser transfectadas simultáneamente con pIG.E1A.E1B y pIG.NEO (u otro vector de expresión que contenga NEO). Los clones resistentes a G418 son sometidos a ensayo en cuanto a su capacidad para soportar la propagación del adenovirus recombinante con E1 suprimida, tales como IG.Ad.MLPI.TK y utilizados para la generación y producción del adenovirus recombinante con E1 suprimida y serán aplicados *in vivo* para la producción local del virus recombinante, como se describe para las células diploides (ver arriba).

Todas las líneas celulares, incluyendo las líneas celulares diploides transformadas o las líneas establecidas resistentes a NEO, pueden ser utilizadas como base para la generación de líneas de empaquetamiento de "la siguiente generación", que soporten la propagación de los adenovirus recombinantes carentes de E1, que también portan deleciones en otros genes, tales como E2A y E4. Por otra parte, proporcionarán la base para la generación de vectores adenovirales mínimos como se describe aquí.

### 55 *Líneas celulares que expresan E2*

Se utilizan y se utilizarán células de empaquetamiento que expresen secuencias E2A para la generación y producción (a gran escala) de adenovirus recombinante con E2A suprimida.

Las líneas celulares de empaquetamiento de adenovirus humano recién generadas o las líneas celulares derivadas de especies permisivas para adenovirus humano (E2A o ts125E2A; E1A + E2A; E1A + E1B + E2A; E1A + E2A/TS125; E1A + E1B + E2A/TS125) o las líneas celulares no permisivas tales como células de mono (hrE2A o hr + ts125E2A; E1A + hrE2A; E1A + E1B + hrE2A; E1A + hrE2A/ts125; E1A + E1B + hrE2A/ts125) son y serán utilizadas para la generación y producción (a gran escala) de vectores adenovirus recombinante con E2A suprimida. Además, serán aplicadas *in vivo* para la producción local del virus recombinante, como se describe para las células diploides (ver arriba).



## ES 2 231 813 T3

### *Vectores de adenovirus novedosos*

Los vectores de adenovirus recién desarrollados que albergan una delección de E1 de los nt. 459-3.510 serán utilizados para el propósito de la transferencia génica. Estos vectores también son la base para el desarrollo de vectores de adenovirus sometidos a delección adicionalmente que son mutados v.g. para E2A, E2B o E4. Tales vectores serán generados v.g. sobre las líneas celulares de empaquetamiento recién desarrolladas descritas antes (ver 1-3).

### *Sistema de empaquetamiento de adenovirus mínimo*

Los autores de la presente invención describen constructos de empaquetamiento de adenovirus (que van a ser utilizados para el empaquetamiento de vectores de adenovirus mínimos) que pueden tener las siguientes características:

- a. el constructo de empaquetamiento replica
- b. el constructo de empaquetamiento no puede ser empaquetado porque la señal de empaquetamiento está suprimida
- c. el constructo de empaquetamiento contiene una secuencia formadora de horquilla interna (ver la sección "Experimental; horquilla sugerida", ver la Fig. 15).
- d. debido a la estructura de horquilla interna, el constructo de empaquetamiento se vuelve dos veces más largo de lo que era antes de la transfección en la célula de empaquetamiento (en la muestra de los autores de la presente invención se duplica de 35 a 70 kb). Esta duplicación también evita el empaquetamiento. Obsérvese que esta molécula de ADN duplicada tiene una ITR en ambos extremos (ver v.g. Fig. 13)
- e. esta molécula de empaquetamiento duplicada es capaz de replicar como una molécula de ADN de "adenovirus normal"
- f. la duplicación del genoma es un requisito previo para la producción de niveles suficientes de proteínas de adenovirus, requeridos para empaquetar el vector de adenovirus mínimo
- g. el constructo de empaquetamiento no tiene secuencias solapantes con el vector mínimo o secuencias celulares que puedan conducir a la generación de ARC mediante recombinación homóloga.

Este sistema de empaquetamiento será utilizado para producir vectores de adenovirus mínimos. Las ventajas de los vectores de adenovirus mínimos v.g. para la terapia génica con propósitos de vacunación, son bien conocidas (acomodación de hasta 38 kb; extirpación de todos los genes de adenovirus potencialmente tóxicos e inmunogénicos).

Los vectores de adenovirus que contienen mutaciones en los genes esenciales (incluyendo vectores de adenovirus mínimos) también pueden ser propagados utilizando este sistema.

### *Uso de vectores que expresan E2 intracelular*

Se generan vectores de adenovirus mínimos utilizando las funciones coadyuvantes proporcionadas en trans por las moléculas coadyuvantes de replicación deficiente de empaquetamiento. Las secuencias ITR derivadas de adenovirus sirven como orígenes de replicación de ADN en presencia al menos de los productos del gen E2. Cuando los productos del gen E2 son expresados a partir de los genes del genoma del vector (N.B. los genes deben estar dirigidos por un promotor independiente de E1), el genoma del vector puede replicar en las células diana. Esto permitirá incrementar significativamente el número de moléculas molde en las células diana, y, como resultado un incremento de la expresión de los genes de interés codificados por el vector. Esto resulta de particular interés para los enfoques de la terapia génica en el cáncer.

### *Aplicaciones de la amplificación intracelular de los fragmentos de ADN lineales*

Asimismo se podría considerar un enfoque similar si se desea la amplificación de los fragmentos de ADN lineal. Los fragmentos de ADN de secuencia conocida o desconocida pueden ser amplificados en células que contienen los productos del gen E2 si al menos una secuencia ITR está localizada cerca de su extremo o en él. No hay limitaciones aparentes sobre el tamaño del fragmento. Incluso fragmentos mucho mayores que el genoma de adenovirus (36 kb) puede ser amplificados utilizando este enfoque. Por tanto es posible clonar grandes fragmentos en células de mamífero sin enviar el fragmento a la bacteria (tal como *E. coli*) o utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (P.C.R.). En la fase final de la infección de adenovirus productiva una única célula puede contener más de 10.000 copias del genoma viral. En la situación óptima, los fragmentos de ADN lineal pueden ser amplificados a niveles similares. Así, se debe ser capaz de extraer más de 5  $\mu$ g de fragmento de ADN por 10 millones de células (para un fragmento de 35 kpb). Este sistema puede ser utilizado para expresar proteínas heterólogas (equivalente al sistema de células COS basado en el Virus de Simios 40) para la investigación o para fines terapéuticos. Además, el sistema puede ser utilizado para identificar genes en fragmentos grandes de ADN. Se pueden amplificar fragmentos de ADN al azar (después de la adición de ITR) y expresar durante la amplificación intracelular. La elección, o selección de esas células con el fenotipo deseado puede ser utilizada para enriquecer el fragmento de interés y para aislar el gen.

**Sección experimental**

*Generación de líneas celulares capaces de complementar in trans los vectores de adenovirus recombinante carentes de E1*

5 1. *Línea celular 911*

Los autores de la presente invención generaron una línea celular que alberga las secuencias E1 del adenovirus de tipo 5, susceptible de complementar in trans un adenovirus recombinante con E1 suprimida (Fallaux y col., 1996).

Esta línea celular fue obtenida mediante transfección de retinoblastos embrionarios humanos diploides (HER) con pAd5XhoIC, que contiene los nt. 80 - 5.788 de Ad5; uno de los transformantes resultantes fue denominado 911. Se ha demostrado que esta línea celular es muy útil en la propagación de adenovirus recombinantes carentes de E1. Se encontró que era superior a las células 293. A diferencia de las células 293, las células 911 carecen de un fenotipo totalmente transformado, que muy probablemente es la causa del mejor funcionamiento como línea de empaquetamiento de adenovirus:

se pueden realizar más rápido los análisis en placa (4 - 5 días en lugar de 8 - 14 días en 293),

las monocapas de células 911 sobreviven mejor bajo una cubierta de agar de lo requerido para los análisis en placa, superior amplificación de los vectores con E1 suprimida.

Además, a diferencia de las células 293 que fueron transfectadas con ADN adenoviral sometido a cizalla, las células 911 fueron transfectadas utilizando un constructo definido. Las eficacias de transfección de las células 911 son comparables a las de 293.

*Nuevos constructos de empaquetamiento*

*Fuente de secuencias de adenovirus*

Las secuencias de adenovirus derivan o bien de pAd5.SalB, conteniendo los nt. 80 - 9.460 del adenovirus de tipo 5 humano (Bernards y col., 1983) o bien de ADN de Ad5 de tipo salvaje.

pAd5.SalB fue digerido con Sall y XhoI y el fragmento grande fue religado y este nuevo clon fue denominado pAd5.X/S.

El constructo pTN (construido por el Dr. R. Vogels, IntroGene, Holanda) fue utilizado como fuente de promotor PGK humano y de gen NEO.

*Promotor PGK Humano y gen NEO<sup>R</sup>*

La transcripción de las secuencias de E1A en los nuevos constructos de empaquetamiento es dirigida por el promotor PGK humano (Michelson y col., 1983; Singer-Sam y col., 1984), derivado del plásmido pTN (donación de R. Vogels), que utiliza pUC119 (Vieira y Messing, 1987) como esqueleto. Este plásmido también fue utilizado como una fuente de gen NEO fusionado a la señal de poli-adenilación del Virus de la Hepatitis B (HBV).

*Fusión del promotor PGK a los genes E1 (Fig. 1)*

Con el fin de reemplazar las secuencias de E1 de Ad5 (ITR, origen de replicación y señal de empaquetamiento) por secuencias heterólogas los autores de la presente invención amplificaron las secuencias E1 (nt. 459 a nt. 960) de Ad5 mediante PCR, utilizando los cebadores Ea1 y Ea2 (ver la Tabla I). El producto de la PCR resultante fue digerido con ClaI y ligado en Bluescript (Stratagene), predigerido con ClaI y EcoRV, dando como resultado el constructo pBS.PCRI.

El vector pTN fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI (parcialmente) y ScaI, y el fragmento de ADN que contenía las secuencias promotoras de PGK fue ligado en PBS.PCRI digerido con ScaI y EcoRI. El constructo resultante PBS.PGK.PCRI contiene el promotor PGK humano conectado operativamente a las secuencias E1 de Ad5 desde el nt. 459 al nt. 916.

*Construcción de pIG.E1A.E1B.X (Fig. 2)*

pIG.E1A.E1B.X fue elaborado reemplazando el fragmento ScaI-BspEI de pAT-X/S por el correspondiente fragmento de PBS.PGK.PCRI (conteniendo el promotor PGK conectado a las secuencias de E1A).

pIG.E1A.E1B.X contiene las secuencias codificadoras de E1A y E1B bajo la dirección del promotor PGK.

## ES 2 231 813 T3

Como las secuencias Ad5 desde el nt. 459 al nt. 5.788 de Ad5 están presentes en este constructo, también la proteína pIX del adenovirus está codificada por este plásmido.

### *Construcción de pIG.E1A.NEO (Fig. 3)*

5 Con el fin de introducir el promotor de E1B completo y fusionar este promotor de tal manera que el codón AUG de E1B de 21 kd funcione exactamente como el codón AUG de NEO<sup>R</sup>, los autores de la presente invención amplificaron el promotor E1B utilizando los cebadores Ea3 y Ep2, donde el cebador Ep2 introduce un sitio NcoI en el fragmento de la PCR. El fragmento de la PCR resultante, denominado PCR2, fue digerido con HpaI y NcoI y ligado en pAT-X/S, que había sido predigerido con HpaI y con NcoI. El plásmido resultante fue denominado pAT-X/S-PCR2. El fragmento NcoI-StuI de pTN, que contenía el gen NEO y parte de la señal de poli-adenilación del Virus de la Hepatitis B (HBV), fue clonado en pAT-X/S-PCR2 (digerido con NcoI y NruI). El constructo resultante: pAT-PCR2-NEO. La señal de poliadenilación fue completada reemplazando el fragmento ScaI-SalI de pAT-PCR2-NEO por el correspondiente fragmento de pTN (dando como resultado pAT.PCR2-NEO.p(A)). El ScaI-XbaI de pAT.PCR2-NEO.p(A) fue reemplazado por el correspondiente fragmento de pIG.E1A.E1B-X, conteniendo el promotor PGK conectado a los genes E1A.

El constructo resultante fue denominado pIG.E1A.NEO, y contiene por lo tanto las secuencias E1 de Ad5 (nt. 459 a nt. 1.713) bajo el control del promotor PGK humano.

### *Construcción de pIG.E1A.E1B (Fig. 4)*

5 pIG.E1A.E1B fue elaborado amplificando las secuencias que codificaban los aminoácidos N-terminales de E1B de 55 kd utilizando los cebadores Eb1 y Eb2 (introduce un sitio XhoI). El fragmento de la PCR resultante fue digerido con BglII y clonado en BglII/NruI de pAT-X/S, obteniéndose de ese modo pAT-PCR3.

pIG.E1A.E1B fue construido introduciendo las secuencias poli(A) de HBV de pIG.E1A.NEO aguas abajo de las secuencias de E1B de pAT-PCR3 mediante intercambio del fragmento XbaI - SalI de pIG.E1A.NEO y el fragmento XbaI XhoI de pAT.PCR3.

30 pIG.E1A.E1B contiene los nt. 459 a nt. 3.510 de Ad5, que codifican las proteínas E1A y E1B. Las secuencias de E1B están terminadas en el aceptor de empalme en el nt. 3.511. No se encuentran secuencias pIX en este constructo.

### *Construcción de pIG.NEO (Fig. 5)*

35 pIG.NEO fue generado clonando el fragmento HpaI - ScaI de pIG.E1A.NEO, conteniendo el gen NEO bajo el control del promotor E1B de Ad5, en pBS digerido con EcoRV y ScaI.

Este constructo se utiliza cuando se transfectan células establecidas con constructos E1A.E1B y se requiere selección NEO. Debido a que la expresión de NEO está dirigida por el promotor E1B, se espera que las células resistentes a NEO expresen simultáneamente E1A, lo que también es ventajoso para mantener elevados niveles de expresión de E1A durante el cultivo a largo plazo de las células.

### *Análisis de los constructos*

45 La integridad de los constructos pIG.E1A.NEO, pIG.E1A.E1B.X y pIG.E1A.E1B fue evaluada mediante mapeo con enzimas de restricción; además, partes de los constructos que habían sido obtenidos mediante análisis PCR fueron confirmados mediante análisis de la secuencia. No se encontraron cambios en la secuencia de nucleótidos.

50 Los constructos fueron transfectados en células BRK (Baby Rat Kidney) primarias y sometidos a ensayo en cuanto a su capacidad para inmortalizar (pIG.E1A.NEO) o transformar completamente (pAd5.XhoIC, pIG.E1A.E1B.X y pIG.E1A.E1B) estas células.

55 Los riñones de ratas WAG-Rij de 6 días de edad fueron aislados, homogeneizados y tratados con tripsina. Se transfectaron placas subconfluentes (5 cm de diámetro) de los cultivos de células BRK con 1 o 5  $\mu$ g de pIG.NEO, pIG.E1A.NEO, pIG.E1A.E1B, pIG.E1A.E1B.X, pAd5XhoIC, o con pIG.E1A.NEO junto con PDC26 (Van der Elsen y col., 1983), que portaban el gen Ad5.E1B bajo el control del promotor temprano de SV40. Tres semanas después de la transfección, cuando los focos eran visibles, las placas fueron fijadas, teñidas con Giemsa y sometidas a recuento de los focos.

60 Una visión de conjunto de los constructos de empaquetamiento de adenovirus generados, y de su capacidad para transformar BRK, se presenta en la Fig. 6. Los resultados indican que los constructos pIG.E1A.E1B y pIG.E1A.E1B.X son capaces de transformar células BRK de una manera dependiente de la dosis. La eficacia de la transformación es similar para ambos constructos y es comparable a la encontrada con el constructo que se utilizaba para elaborar las células 911, esto es pAd5.XhoIC.

65 Como se esperaba, pIG.E1A.NEO apenas era capaz de inmortalizar BRK. No obstante, la co-transfección de un constructo de expresión de E1B (PDC26) daba como resultado un incremento significativo del número de transfor-

## ES 2 231 813 T3

mantas (18 versus 1), indicando que la E1A codificada por pIG.E1A.NEO es funcional.

Los autores de la presente invención concluyen por lo tanto, que los constructos de empaquetamiento recién generados son adecuados para la generación de nuevas líneas de empaquetamiento de adenovirus.

### *Generación de líneas celulares con nuevos constructos de empaquetamiento. Líneas celulares y cultivo celular*

Se hicieron crecer células de carcinoma bronquial A549 humano (Shapiro y col., 1978), retinoblastos embrionarios humanos (HER), células de riñón embrionario humano (HEK) transformadas con Ad5-E1 (293; Graham y col., 1977) y células HER transformadas con Ad5 (911, Fallaux y col., 1996) y células PER en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con Suero de Ternera Fetal al 10% (FCS) y antibióticos en una atmósfera con el 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio de cultivo, los reactivos y los sueros fueron adquiridos de Gibco Laboratories (Grand Island, NY). Los plásticos para el cultivo fueron adquiridos de Greiner (Nürtingen, Alemania) y Corning (Corning, NY).

### *Virus y técnicas virales*

La construcción de los vectores adenovirales IG.Ad.MLP.nls.lacZ, IG.Ad.MLP.luc, IG.Ad.MLP.TK e IG.Ad.CMV.TK se describe con detalle en la solicitud de patente EP 0707071.

El vector adenoviral IG.Ad.MLP.nls.lacZ contiene el gen lacZ de *E. coli*, que codifica la  $\beta$ -galactosidasa, bajo el control del promotor tardío principal (MLP) de Ad2. IG.Ad.MLP.luc contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga dirigido por el MLP de Ad2. Los vectores adenovirales IG.Ad.MLP.TK e IG.Ad.CMV.TK contienen el gen de la timidina quinasa (TK) del Virus Herpes Simplex bajo el control del MLP de Ad2 y el intensificador/promotor de Citomegalovirus (CMV), respectivamente.

### *Transfecciones*

Todas las transfecciones se realizaron mediante ADN precipitado con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973) con el GIBCO Calcium Phosphate Transfection System (GIBCO BRL Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA), según el protocolo de los fabricantes.

### *Transferencia Western*

Se lavaron con PBS cultivos subconfluentes de células 293, 911 y A549 y PER transformadas con Ad5-E1 que crecían exponencialmente y se rasparon en tampón Fos-RIPA (Tris 10 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, NP40 al 1%, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1%, NA-DOC al 1%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 M, inhibidor de tripsina 0,5 mM, NaF 50 mM y vanadato de sodio 1 mM). Al cabo de 10 minutos a la temperatura ambiente, los productos lisados fueron aclarados por centrifugación. Las concentraciones de proteína fueron medidas con el estuche de análisis de proteínas de Biorad, y se cargaron 25  $\mu$ g de proteína celular total sobre un gel de SDS-PAA al 12,5%. Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa (1h a 300 mA). Los patrones teñidos previamente (Sigma, USA) se desarrollaron en paralelo. Los filtros fueron bloqueados con seralbúmina bovina (BSA) al 1% en TBST (Tris 10 mM, pH 8, NaCl 15 mM, y Tween-20 al 0,05%) durante una hora. Los primeros anticuerpos fueron el anticuerpo A1C6 anti-Ad5-E1B de 55 kDa monoclonal de ratón (Zantema y col., no publicado), el anticuerpo C1G11 anti-Ad5-E1B de 221 kDa monoclonal de rata (Zantema y col., 1985). El segundo anticuerpo era un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Promega). Las señales fueron visualizadas mediante aumento de la quimioluminiscencia (Amersham Corp. UK).

### *Análisis por transferencia Southern*

Se aisló ADN de elevado peso molecular y se digirieron 10  $\mu$ g por completo y se fraccionaron sobre un gel de agarosa al 0,7%. Se realizó la transferencia Southern a Hybond N+ (Amersham, UK) con una solución de transferencia de NaOH 0,4 M, NaCl 0,6 M (Church and Gilbert, 1984). La hibridación se realizó con un fragmento SspI-HindIII de 2.463 nt. De pAd5.SalB (Bernards y col., 1983). Este fragmento consta de los pb. 342-2.805 de pAd5. El fragmento fue radiomarcado con dCTP  $\alpha$ -P<sup>32</sup> con el uso de cebadores hexanucleotídicos al azar y ADN polimerasa de Klenow. Las transferencias Southern fueron expuestas a una película Kodak XAR-5 a -80°C y a una pantalla Phospho-Imager que fue analizada mediante el soporte lógico B & L Systems Molecular Dynamics.

### *A549*

Se generaron líneas celulares de carcinoma bronquial humano A549 transformadas con Ad5-E1 mediante transfección con pIG.E1A.NEO y selección en cuanto a la resistencia a G418. Se establecieron treinta y un clones resistentes a G418. La co-transfección de pIG.E1A.E1B con pIG.NEO rindió siete líneas celulares resistentes a G418.

### *PER*

Se generaron células de retina embrionaria humana (HER) transformadas con Ad5-E1 mediante transfección de células HER primarias con el plásmido pIG.E1A.E1B. Las líneas celulares transformadas fueron establecidas a partir

## ES 2 231 813 T3

de focos bien separados. Los autores de la presente invención fueron capaces de establecer siete líneas celulares clonales, que denominaron PER.C1, PER.C3, PER.C4, PER.C5, PER.C6, PER.C8 y PER.C9.

Uno de los clones PER, a saber PER.C6, ha sido consignado en la ECACC con el número 96022940.

5

### *Expresión de los genes E1A y E1B de Ad5 en células A549 y PER transformadas*

La expresión de las proteínas E1A y E1B de 55 kDa y 21 kDa de Ad5 en las células A549 y PER establecidas fue estudiada por medio de transferencia Western, utilizando anticuerpos monoclonales (mAb). El mAb M73 reconoce los productos de E1A, mientras los mAb AIC6 y CIGII están dirigidos contra las proteínas E1B de 55 kDa y de 21 kDa, respectivamente.

Los anticuerpos no reconocían las proteínas en los extractos de las células A549 parentales o de las células HER primarias (datos no mostrados). Ninguno de los clones de A549 que se generaban por co-transfección de pIG.NEO y pIG.E1A.E1B expresaba niveles detectables de las proteínas E1A o E1B (no mostrados). Algunos de los clones de A549 que se generaban por transfección con pIG.E1A.NEO expresaban las proteínas E1A de Ad5 (Fig. 7), pero los niveles eran muy inferiores a los detectados en los productos lisados de proteína de las células 293. Los niveles de E1A en estado estacionario detectados en los extractos de proteína de las células PER eran muy superiores a los detectados en los extractos de células derivadas de A549. Todas las líneas celulares PER expresaban niveles similares de proteínas E1A (Fig. 7). La expresión de las proteínas E1B, concretamente en el caso de E1B de 55 kDa, era más variable. En comparación con 911 y 293, la mayoría de los clones de PER expresan elevados niveles de E1B de 55 kDa y de 21 kDa. El nivel en estado estacionario de E1B de 55 kDa en PER-C3 era el más alto. Ninguno de los clones de PER perdía expresión de los genes E1 de Ad5 tras el paso seriado de las células (no mostrado). Los autores de la presente invención encontraron que el nivel de expresión de E1 en las células PER permanecía estable durante al menos 100 duplicaciones de la población. Los autores de la presente invención decidieron caracterizar los clones de PER con más detalle.

### *Análisis Southern de clones de PER*

Para estudiar la disposición de las secuencias que codifican E1 de Ad5 en los clones de PER se realizaron análisis Southern. El ADN celular fue extraído de todos los clones de PER, y de las células 293 y 911. El ADN fue digerido con HindIII, que corta una vez en la región E1 de Ad5. La hibridación de Southern del ADN digerido con HindIII, utilizando una sonda específica para E1 de Ad5 radiomarcada reveló la presencia de numerosas copias integradas de pIG.E1A.E1B en el genoma de los clones de PER. La Figura 8 muestra el patrón de distribución de las secuencias de E1 en el ADN de elevado peso molecular de las diferentes líneas celulares PER. Las copias se concentran en una única banda, lo que sugiere que están integradas como repeticiones en tándem. En el caso de PER.C3, C5, C6 y C9 los autores de la presente invención encontraron bandas de hibridación adicionales de bajo peso molecular que indican la presencia de copias truncadas de pIG.E1A.E1B. El número de copias fue determinado utilizando un Phospho-Imager. Los autores de la presente invención estimaron que PER.C1, C3, C4, C5, C6, C8 y C9 contienen 2, 88, 5,4, 5, 5 y 3 copias de la región codificadora de E1 de Ad5, respectivamente, y que las células 911 y 293 contienen 1 y 4 copias de las secuencias E1 de Ad5, respectivamente.

### *Eficacia de transfección*

Se generan adenovectores recombinantes mediante co-transfección de plásmidos adaptadores y del fragmento ClaI grande de Ad5 en células 293 (ver la solicitud de patente 0707071). El ADN del virus recombinante se forma mediante recombinación homóloga entre las secuencias virales homólogas que están presentes en el plásmido y el ADN de adenovirus. La eficacia de este método, así como la de las estrategias alternativas, depende enormemente de la transfectabilidad de las células coadyuvantes. Por lo tanto, los autores de la presente invención compararon las eficacias de transfección de algunos de los clones de PER con células 911, utilizando el gen lacZ que codifica a  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* como informador (Fig. 9).

### *Producción de adenovirus recombinante*

Los rendimientos de adenovirus recombinantes obtenidos tras la inoculación de 293, 911, PER.C3, PER.C5 y PER.C6 con diferentes vectores de adenovirus se presentan en la Tabla II.

Los resultados indican que los rendimientos obtenidos en las células PER son al menos tan elevados como los obtenidos en líneas celulares existentes.

Además, los rendimientos del vector de adenovirus novedoso IG.Ad.MLPI.TK son similares o superiores a los rendimientos obtenidos para otros vectores virales en todas las líneas celulares sometidas a ensayo.

### *Generación de nuevos vectores de adenovirus (Fig. 10)*

Los vectores de adenovirus recombinantes utilizados (ver la solicitud de patente 0707071) tienen suprimidas las secuencias E1 de 459 al nt. 3.328.

## ES 2 231 813 T3

Como el constructo pIG.E1A.E1B contiene la secuencia de los nt. 459 a 3.510 de Ad5 existe un solapamiento de la secuencia de 183 nt. Entre las secuencias E1B del constructo de empaquetamiento pIG.E1A.E1B y los adenovirus recombinantes, tales como v.g. IG.Ad.MLP.TK. Las secuencias solapantes son suprimidas de los nuevos vectores de adenovirus. Además, las secuencias no codificadoras derivadas de lacZ, que están presentes en los constructos originales, también fueron suprimidas. Esto se logró (ver la Fig. 19) mediante amplificación por PCR de las secuencias poli(A) de SV40 de pMLP.TK utilizando los cebadores SV40-1 (introduce un sitio BamHI) y SV40-2 (introduce un sitio BglII). Además, las secuencias de Ad5 presentes en este constructo fueron amplificadas desde el nt. 2.496 (Ad4, introduce un sitio BglII) a nt. 2.779 (Ad5-2). Ambos fragmentos de PCR fueron digeridos con BglII y ligados. El producto de ligadura fue amplificado mediante PCR utilizando los cebadores SV40-1 y Ad5-2. El producto de la PCR obtenido fue cortado con BamHI y AflII y fue ligado en pMLP.TK digerido previamente con las mismas enzimas. El constructo resultante, denominado pMLPI.TK, contiene una delección en las secuencias E1 del adenovirus desde el nt. 459 al nt. 3.510.

### 15 *Sistema de empaquetamiento*

La combinación del nuevo constructo de empaquetamiento pIG.E1A.E1B y el adenovirus recombinante pMLPI.TK, que no tienen ningún solapamiento de secuencia, se presenta en la Figura 11. En esta figura, también se presenta la situación original, donde se indica el solapamiento de la secuencia.

20 La ausencia de secuencias solapantes entre pIG.E1A.E1B y pMLPI.TK (Fig. 11a) excluye la posibilidad de recombinación homóloga entre el constructo de empaquetamiento y el virus recombinante, y por lo tanto es una mejora significativa para la producción de adenovirus recombinante en comparación con la situación original.

En la Fig. 11b se representa la situación para pIG.E1A.NEO e IG.Ad.MLPI.TK. Se espera que cuando pIG.E1A.NEO es transfectado a células establecidas, sea suficiente para soportar la propagación del adenovirus recombinante con E1 suprimida. Esta combinación no tiene ningún solapamiento de secuencia, evitando la generación de ARC mediante recombinación homóloga. Además, este sistema de empaquetamiento conveniente permite la propagación de adenovirus recombinantes que tienen suprimidas sólo las secuencias E1A y no las secuencias E1B. Los adenovirus recombinantes que expresan E1B en ausencia de E1A son atractivos, ya que la proteína E1B, en particular E1B de 19 kD, es capaz de evitar la lisis de las células humanas infectadas mediante el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (Gooding y col., 1991).

### 30 *Generación del adenovirus recombinante derivado de pMLPI.TK*

35 Se generó un adenovirus recombinante mediante co-transfección de células 293 con ADN de pMLPI.TK linealizado con SalI y ADN wt de Ad5 linealizado con ClaI. El procedimiento se representa esquemáticamente en la Fig. 12.

### 40 *Esbozo de la estrategia para generar sistemas de empaquetamiento para un vector de adenovirus mínimo*

Convención de los nombres de los plásmidos utilizados:

- P plásmido
- 45 I ITR (Repetición Terminal Invertida de Adenovirus)
- C Combinación de Intensificador/Promotor de Citomegalovirus (CMV)
- L Horquilla Potencial hac,haw de la Secuencia Codificadora de Luciferasa de Luciérnaga que puede formarse tras la digestión con la endonucleasa de restricción Asp718 en su orientación correcta e inversa, respectivamente (Fig. 15).

55 V.g. pICLhaw es un plásmido que contiene la ITR de adenovirus seguida del gen de la luciferasa dirigido por CMV y la horquilla de Asp178 en orientación inversa (no funcional).

1.1 Demostración de la competencia de una secuencia de ADN sintética, que es capaz de formar una estructura en horquilla, para servir como cebador para la síntesis de hebra inversa para la generación de moléculas de ADN de doble hebra en células que contienen y expresan genes de adenovirus.

60 Los plásmidos pICLhac, pICLhaw, pICLI y pICL fueron generados utilizando mecanismos normalizados. La representación esquemática de estos plásmidos se muestra en las Figs. 16-19.

El plásmido pICL deriva de los siguientes plásmidos:

- 65 nt. 1 - 457 pMLP10 (Levrero y col., 1991)
- nt. 458 - 1.218 pCMV $\beta$  (Clontech, EMBL Bank Núm. U02451)

## ES 2 231 813 T3

nt. 1.219 - 3.016 pMLP.luc (IntroGene, no publicado)

nt. 3.017 - 5.620 pBLCAT5 (Stein and Whelan, 1989)

5 El plásmido fue construido como sigue:

El gen *tet* del plásmido pMLP10 ha sido inactivado mediante delección del fragmento BamHI-SalI, para generar pMLP10 $\Delta$ SB. Utilizando un grupo de cebadores PCR/MLP1 y PCR/MLP3 se amplificó un fragmento de 210 pb que contenía la ITR de Ad5, flanqueada por un sitio de restricción SalI sintético utilizando ADN de pMLP10 como molde. El producto de la PCR fue digerido con las enzimas EcoRI y SgrAI para generar un fragmento de 196 pb. El plásmido pMLP10 $\Delta$ SB fue digerido con EcoRI y SgrAI para separar la ITR. Este fragmento fue remplazado por el fragmento de la PCR tratado con EcoRI-SgrAI para generar pMLP/SAL. El plásmido pCMV-Luc fue digerido con PvuII por completo y se hizo circular de nuevo para separar la señal de poliadenilación derivada de SV40 y las secuencias de Ad5 con excepción del extremo izquierdo de Ad5. En el plásmido resultante, pCMV-luc $\Delta$ Ad, se remplazó la ITR de Ad5 por la ITR flanqueada por el sitio Sal del plásmido pMLP/SAL intercambiando los fragmentos XmnI-SacII. El plásmido resultante, pCMV-luc $\Delta$ Ad/SAL, el extremo izquierdo de Ad5 y el gen de la luciferasa dirigido por CMV fueron aislados en forma de fragmento SalI-SmaI e insertados en el plásmido pBLCATS digerido con SalI y HpaI, para formar el plásmido pICL. El plásmido pICL está representado en la Fig. 19; su secuencia se presenta en la Fig. 20.

20 *Plásmido pICL contiene las siguientes características:*

nt. 1-457	Extremo izquierdo de Ad5 (Secuencia 1-457 de adenovirus humano de tipo 5)
nt. 458-969	Intensificadoras e inmediatas de citomegalovirus humano
25 promotor temprano	(Boshart y col., 1985) (del plásmido pCMV $\beta$ , Clontech, Palo Alto, USA)
nt. 970-1.204	Gen de luciferasa de luciérnaga (de pMLP.luc)
nt. 3.018-3.131	señales de poliadenilación en tándem de SV40 del transcrito tardío, derivado del plásmido pBLCAT5)
30 nt. 3.132-5.620	esqueleto pUC12 (derivado del plásmido pBLCAT5)
nt. 4.337-5.191	gen de la $\beta$ -lactamasa (gen de resistencia a Amp, orientación inversa)

*Plásmido pICLhac y pICLhaw*

35 Los plásmidos pIVLhac y pICLhaw derivaban del plásmido pICL mediante digestión del último plásmido con la enzima de restricción Asp718. El plásmido linealizado fue tratado con Fosfatasa Alcalina de Intestino de Ternera para separar los 51 grupos fosfato. Los oligonucleótidos de hebra sencilla sintéticos parcialmente complementarios Hp/asp1 y Hp/asp2 fueron recocidos y fosforilados en sus extremos 5' utilizando polinucleótido quinasa de T4.

40 Los oligómeros de doble hebra fosforilada fueron mezclados con el fragmento pICL desfosforilado y ligados. Los clones que contenían una única copia del oligonucleótido sintético insertada en el plásmido fueron aislados y caracterizados utilizando productos digeridos con enzimas de restricción. La inserción del oligonucleótido en el sitio Asp718 recreará en un empalme un sitio de reconocimiento de Asp718, mientras en el otro empalme el sitio de reconocimiento será desorganizado. La orientación y la integridad del oligonucleótido insertado fueron verificadas en clones seleccionados mediante análisis de la secuencia. Un clon que contenía el oligonucleótido en la orientación correcta (el sitio Asp718 próximo al sitio 3.205 de EcoRI) fue denominado pICLhac. Un clon con el oligonucleótido en la orientación inversa (el sitio Asp718 próximo a la señal poli derivada de SV40) fue denominado pICLhaw. Los plásmidos pICLhac y pICLhaw están representados en las Figs. 16 y 17.

50 El plásmido pICLI fue creado a partir del plásmido pICL mediante inserción del fragmento SalI-SgrAI de pICL, conteniendo la ITR de Ad5 en el sitio Asp718 de pICL. El fragmento SalI-SgrAI de 194 pb fue aislado de pICL, y los extremos cohesivos fueron convertidos en extremos romos utilizando ADN polimerasa I de *E. coli* (fragmento de Klenow) y dNTP. Los extremos cohesivos de Asp718 fueron convertidos en extremos romos mediante tratamiento con nucleasa de judía mung. Mediante ligadura se generaron clones que contenían la ITR en el sitio Asp718 del plásmido pICL. Un clon que contenía el fragmento ITR en la orientación correcta fue denominado pICLI (Fig. 18). Generación de adenovirus Ad-CMV-hcTK. Se construyó un adenovirus recombinante según el método descrito en la solicitud de Patente EP 0707071. Se requieren dos componentes para generar un adenovirus recombinante. Primero, un plásmido adaptador conteniendo el extremo izquierdo del genoma de adenovirus conteniendo la ITR y la señal de empaquetamiento, una casete de expresión con el gen de interés, y una porción del genoma de adenovirus que puede ser utilizada para la recombinación homóloga. Además, se necesita ADN de adenovirus para la recombinación con el plásmido adaptador anteriormente mencionado. En el caso de Ad-CMV-hcTK, se utilizó el plásmido PCMV.TK como base. Este plásmido contiene los nt. 1-455 del genoma de adenovirus de tipo 5, los nt. 456-1.204 derivados de pCMV $\beta$  (Clontech, el fragmento PstI-StuI que contiene el promotor intensificador de CMV y el intrón 16S/19S del Virus de Simios 40), el gen de la timidina quinasa del Virus Herpes Simplex (descrito en la solicitud de Patente EP 0707071), la señal de poliadenilación derivada de SV40 (nt. 2.533-2.668 de la secuencia de SV40), seguido del fragmento BgIII-ScaI de Ad5 (nt. 3.328-6.092 de la secuencia de Ad5). Estos fragmentos están presentes en un esqueleto derivado de pMLP10 (Levero y col., 1991). Para generar el plásmido pAD-CMVhc-TK, se digirió el plásmido pCMV.TK con ClaI (el único sitio ClaI está localizado inmediatamente curso arriba del marco de lectura abierto de TK) y se

desfosforiló con Fosfatasa Alcalina de Intestino de Ternera. Para generar una estructura en horquilla, se recoció los oligonucleótidos sintéticos HP/c1a2 y HP/c2a2 y se fosforilaron en sus grupos 5'-OH con polinucleótido quinasa de T4 y ATP. El oligonucleótido de doble hebra fue ligado con el fragmento del vector linealizado y utilizado para transformar la cepa de *E. coli* "Sure". La inserción del oligonucleótido en el sitio ClaI desorganizará los sitios de reconocimiento ClaI. El oligonucleótido contiene un nuevo sitio ClaI cerca de uno de sus extremos. En los clones seleccionados, la orientación y la integridad del oligonucleótido insertado fueron verificadas mediante análisis de la secuencia. Un clon que contenía el oligonucleótido en la orientación correcta (el sitio ClaI del lado de la ITR) fue denominado pAd-CMV-hcTK. Este plásmido fue co-transfectado con ADN de Adenovirus de tipo 5 de tipo salvaje digerido con ClaI en células 911. Se aisló un adenovirus recombinante en el que la casete de expresión CMV-hcTK reemplaza las secuencias E1 y se propaga utilizando procedimientos normalizados.

Para estudiar si la horquilla puede ser utilizada como cebador para la síntesis de la hebra inversa sobre la hebra desplazada después de que la replicación hubiera comenzado en la ITR, se introduce el plásmido pICLhac en las células 911 (retinoblastos embrionarios humanos transformados con la región E1 de adenovirus). El plásmido pICLhaw sirve como control, que contiene el par de oligonucleótidos HP/asp 1 y 2 en orientación inversa pero que es además completamente idéntico al plásmido pICLhac. También están incluidos en estos estudios los plásmidos pICLI y pICL. En el plásmido pICLI la horquilla es reemplazada por la ITR de adenovirus. El plásmido pICL no contiene ni horquilla ni secuencia ITR. Estos plásmidos sirven como controles para determinar la eficacia de la replicación en virtud de la estructura en horquilla terminal. Para proporcionar los productos virales distintos de las proteínas E1 (éstas son producidas por las células 911) requeridos para la replicación del ADN los cultivos son infectados con el virus IG.Ad.MLPI.TK después de la transfección. Se están estudiando diversos parámetros para demostrar la replicación apropiada de las moléculas de ADN transfectadas. Primero, el ADN extraído de los cultivos celulares transfectados con los plásmidos anteriormente mencionados e infectado con el virus IG.Ad.MLPI.TK está siendo analizado mediante transferencia Southern en cuanto a la presencia de los intermedios de replicación esperados, así como en cuanto a la presencia de genomas duplicados. Además, a partir de las poblaciones de células transfectadas e infectadas con IG.Ad.MLPI.TK se aísla el virus que es capaz de transferir y expresar un gen marcador de luciferasa a células luciferasa negativas.

El ADN plasmídico de los plásmidos pICLhac, pICLhaw, pICLI y pICL ha sido digerido con la endonucleasa de restricción SalI y tratado con nucleasa de judía mung para separar la prolongación de hebra sencilla de 4 nucleótidos del fragmento de ADN resultante. De esta manera se crea un extremo 5' ITR de adenovirus natural en el fragmento de ADN. Con posterioridad, ambos plásmidos pICLhac y pICLhaw fueron digeridos con la endonucleasa de restricción Asp718 para generar el extremo capaz de formar una estructura en horquilla. Los plásmidos digeridos son introducidos en células 911, utilizando la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio normalizada, cuatro placas para cada plásmido. Durante la transfección, para cada plásmido se infectaron dos de los cultivos con el virus IG.Ad.MLPI.TK utilizando 5 partículas IG.Ad.MLPI.TK infecciosas por célula. A las 20 horas de la transfección y a las 40 horas de la transfección se utilizaron un cultivo infectado con el virus Ad.tk y uno no infectado para aislar ADN de bajo peso molecular utilizando el procedimiento ideado por Hirt. Se utilizan alícuotas de ADN aislado para el análisis Southern. Tras la digestión de las muestras con la endonucleasa de restricción EcoRI utilizando el gen de la luciferasa como sonda se detecta un fragmento que hibrida de aproximadamente 2,6 kb sólo en las muestras de células infectadas con adenovirus transfectadas con el plásmido pICLhac. El tamaño de este fragmento coincide con la duplicación anticipada del gen marcador de la luciferasa. Esto apoya la conclusión de que la horquilla insertada es capaz de servir como cebador para la síntesis de la hebra inversa. El fragmento que hibrida está ausente si se omite el virus IG.Ad.MLPI.TK, o si se ha insertado el oligonucleótido en horquilla en orientación inversa.

La endonucleasa de restricción DpnI reconoce la secuencia de tetranucleótidos 5'-GATC-3', pero escinde sólo el ADN metilado, (esto es, sólo ADN (plásmido) propagado en *E. coli* y derivado de *E. coli*, no ADN que ha sido replicado en células de mamífero). La endonucleasa de restricción MboI reconoce las mismas secuencias, pero escinde sólo ADN no metilado (a saber ADN propagado en células de mamífero). Las muestras de ADN aisladas de las células transfectadas son incubadas con MboI y DpnI y analizadas mediante transferencias Southern. Estos resultados demuestran que sólo en las células transfectadas con los plásmidos pICLhac y pICLI están presentes fragmentos resistentes a DpnI grandes, que están ausentes en las muestras tratadas con MboI. Estos datos demuestran que sólo tras la transfección de los plásmidos pICLI y pICLhac se producen la replicación y la duplicación de los fragmentos.

Estos datos demuestran que en los fragmentos de ADN lineales de las células infectadas con adenovirus que tienen en un extremo una repetición terminal invertida (ITR) derivada de adenovirus y en el otro extremo una secuencia de nucleótidos que se pueden reconocer con secuencias de la misma hebra, cuando están presentes en forma de hebra sencilla generan de ese modo una estructura en horquilla, y se convertirán en estructuras que tienen secuencias de repeticiones terminales invertidas en ambos extremos. Las moléculas de ADN resultantes replicarán mediante el mismo mecanismo que los genomas de adenovirus de tipo salvaje.

1.2 Demostración de que las moléculas de ADN que contienen un gen marcador de luciferasa, una única copia de la ITR, la señal de encapsidación y una secuencia de ADN sintética, que es capaz de formar una estructura en horquilla, son suficientes para generar moléculas de ADN que pueden ser encapsidadas en viriones.

Para demostrar que las moléculas de ADN anteriores que contienen dos copias del gen marcador luc de CMV pueden ser encapsidadas en viriones, se cosecha el virus de los dos cultivos restantes por medio de tres ciclos de destrucción por congelación-descongelación y se utiliza para infectar fibroblastos murinos. Cuarenta y ocho horas



## ES 2 231 813 T3

después de la infección las células infectadas son analizadas en cuanto a la actividad luciferasa. Para excluir la posibilidad de que la actividad luciferasa haya sido inducida por la transferencia de ADN libre, en lugar de por las partículas de virus, se tratan las soluciones de partida de virus con ADNasa I para eliminar los contaminantes del ADN. Además, como control adicional, se incuban alícuotas de las soluciones de partida del virus durante 60 minutos a 56°C. El tratamiento con calor no afectará al ADN contaminante, pero inactivará los virus. Sólo se encuentra actividad luciferasa significativa en las células después de la infección con las soluciones de partida de virus derivadas de células infectadas con IG.Ad.MLPI.TK transfectadas con los plásmidos pICLhac y pICLI. Ni en las células no infectadas, ni en las células infectadas transfectadas con pICLhaw y pICL se puede demostrar una actividad luciferasa significativa. La inactivación con calor, pero no el tratamiento con ADNasa I, elimina completamente la expresión de la luciferasa, demostrando que las partículas de adenovirus, y no los fragmentos de ADN libres (contaminantes) son responsables de la transferencia del gen informador de la luciferasa.

Estos resultados demuestran que estos pequeños genomas virales pueden ser encapsidados en partículas de adenovirus y sugieren que la ITR y la señal de encapsidación son suficientes para la encapsidación de fragmentos de ADN lineal en partículas de adenovirus. Estas partículas de adenovirus pueden ser utilizadas para una transferencia génica eficaz. Cuando se introducen en células que contienen y expresan al menos parte de los genes de adenovirus (a saber E1, E2, E4, y L, y VA), las moléculas de ADN recombinante que constan de al menos una ITR, al menos parte de la señal de encapsidación así como una secuencia de ADN sintética, que es capaz de formar una estructura en horquilla, tienen la capacidad intrínseca de generar autónomamente genomas recombinantes que pueden ser encapsidados en viriones. Tales genomas y sistemas vectores pueden ser utilizados para la transferencia génica.

1.3 Demostración de que las moléculas de ADN que contienen los nucleótidos 3.510 - 35.953 (a saber las unidades 9,7 - 100 del mapa) del genoma de adenovirus de tipo 5 (por tanto carecen de las regiones codificadoras de la proteína E1, la ITR derecha y las secuencias de encapsidación) y una secuencia de ADN terminal que es complementaria a una porción de la misma hebra de la molécula de ADN cuando está presente en forma de hebra sencilla distinta de ITR, y como resultado es capaz de formar una estructura en horquilla, pueden replicar en células 911.

Con el fin de desarrollar una molécula de ADN replicante que pueda proporcionar los productos de adenovirus requeridos para permitir que el genoma del vector ICLhac anteriormente mencionado y adenovectores mínimos semejantes sean encapsidados en partículas de adenovirus por células coadyuvantes, se ha desarrollado el vector adenoviral Ad-CMV-hcTK. Entre la región intensificadora/promotora de CMV y el gen de la timidina quinasa se insertó el par de oligonucleótidos recocado HP/c1a 1 y 2. El vector Ad-CMV-hcTK puede ser propagado y producido en células 911 utilizando procedimientos normalizados. Este vector se hace crecer y se propaga exclusivamente como una fuente de ADN utilizada para la transfección. El ADN del virus Ad-CMV-hcTK es aislado de las partículas de virus que habían sido purificadas utilizando la centrifugación en gradiente de densidad de CsCl mediante mecanismos normalizados. El ADN del virus ha sido digerido con la endonucleasa de restricción ClaI. El ADN digerido es fraccionado por tamaños en un gel de agarosa al 0,7% y el fragmento grande es aislado y utilizado para experimentos adicionales. Los cultivos de células 911 son transfectados con el fragmento ClaI grande del ADN de Ad-CMV-hcTK utilizando la técnica de coprecipitación con fosfato de calcio normalizada. Muy probablemente en los experimentos anteriores con el plásmido pICLhac, el AD-CMV-hc replicará partiendo de la ITR derecha. Una vez que la hebra 1 se ha desplazado, se puede formar una horquilla en el extremo izquierdo del fragmento. Esto facilita que la ADN polimerasa alargue la cadena hacia el lado derecho. El proceso continuará hasta que la hebra desplazada se haya convertido completamente en su forma de doble hebra. Finalmente, se recreará la ITR derecha, y en esta localización se producirán el inicio de la replicación y la elongación del adenovirus normal. Obsérvese que la polimerasa leerá a través de la horquilla, duplicando de ese modo la molécula. La molécula de ADN de entrada de 33.250 pb, que tenía en un lado una secuencia ITR de adenovirus y en otro lado una secuencia de ADN que tenía la capacidad de formar una estructura en horquilla, ha sido duplicada ahora, de manera que ambos extremos contengan una secuencia ITR. La molécula de ADN resultante constará de una estructura palindrómica de aproximadamente 66.500 pb.

Esta estructura puede ser detectada en el ADN de bajo peso molecular extraído de las células transfectadas utilizando el análisis Southern. La naturaleza palindrómica del fragmento de ADN puede ser demostrada mediante digestión del ADN de bajo peso molecular con endonucleasas de restricción adecuadas y transferencia Southern con el gen HSV-TK como sonda. Esta molécula puede replicar por sí misma en las células transfectadas en virtud de los productos génicos de adenovirus que están presentes en las células. En parte, los genes de adenovirus son expresados a partir de moldes que están integrados en el genoma de las células diana (a saber los productos génicos de E1), los otros genes residen en el propio fragmento de ADN replicante. Obsérvese sin embargo, que este fragmento de ADN lineal no puede ser encapsidado en viriones. No sólo carece de todas las secuencias de ADN requeridas para la encapsidación, sino que también su tamaño es demasiado grande para ser encapsidado.

1.4 Demostración de que las moléculas de ADN que contienen los nucleótidos 3.505 - 35.953 (a saber unidades 9,7 - 100 del mapa) del genoma del adenovirus de tipo 5 (por tanto carece de las regiones codificadoras de la proteína E1, la ITR derecha y las secuencias de encapsidación) y una secuencia de ADN terminal que es complementaria a una porción de la misma hebra de la molécula de ADN distinta de la ITR, puede replicar en células 911 y puede proporcionar las funciones coadyuvantes requeridas para encapsidar los fragmentos de ADN derivados de pICLI y pICLhac.

La siguiente serie de experimentos pretende demostrar que la molécula de ADN descrita en la parte 1.3 podría ser utilizada para encapsidar los adenovectores mínimos descritos en la parte 1.1 y 1.2.

En los experimentos el fragmento grande aislado tras la digestión con la endonucleasa ClaI del ADN de Ad-CMV-hcTK es introducido en las células 911 (conforme a los experimentos descritos en la parte 1.3) junto con la endonucleasa SalI, la nucleasa de judía mung, el plásmido pICLhac tratado con la endonucleasa Asp718, o en forma de un plásmido pICLhaw tratado de un modo similar de control. Al cabo de 48 horas el virus es aislado mediante destrucción por congelación-descongelación de la población celular transfectada. La preparación de virus es tratada con ADNasa I para separar el ADN libre contaminante. El virus es utilizado con posterioridad para infectar fibroblastos Rat2. Cuarenta y ocho horas después de la infección las células fueron analizadas en cuanto a la actividad luciferasa. Sólo en las células infectadas con virus aislado de las células transfectadas con el plásmido pICLhac, y no con el plásmido pICLhaw, se puede demostrar una actividad luciferasa significativa. La inactivación con calor del virus antes de la infección elimina completamente la actividad luciferasa, indicando que el gen de la luciferasa es transferido por una partícula viral. La infección de la célula 911 con la solución de partida del virus no producía efecto citopatológico alguno, demostrando que pICLhac es producido sin ningún virus coadyuvante infeccioso que pueda ser propagado en las células 911. Estos resultados demuestran que el método propuesto puede ser utilizado para producir soluciones de partida de vectores adenovirales mínimos, que están completamente desprovistos de virus coadyuvantes infecciosos que sean capaces de replicar autónomamente en células humanas transformadas con adenovirus o en células humanas no transformadas con adenovirus.

Además del sistema descrito en esta solicitud, se ha descrito otro enfoque para la generación de vectores de adenovirus mínimos en WO 94/12649. El método descrito en WO 94/12649 explota la función de la proteína IX para el empaquetamiento de vectores de adenovirus mínimos (Vectores Pseudo Adenovirales (PAV) en la terminología de WO 94/12649). Los PAV son producidos clonando un plásmido de expresión con el gen de interés entre las ITR adenovirales izquierda (incluyendo las secuencias requeridas para la encapsidación) y derecha. El PAV es propagado en presencia de un virus coadyuvante. La encapsidación del PAV es preferida en comparación con el virus coadyuvante debido a que el virus coadyuvante es parcialmente deficiente para el empaquetamiento. (O bien en virtud de las mutaciones en la señal de empaquetamiento o bien en virtud de su tamaño (genomas de virus mayores de 37,5 kb se empaquetan ineficazmente). Además, los autores proponen que en ausencia del gen de la proteína IX el PAV será empaquetado preferentemente. Sin embargo, ninguno de estos mecanismos parece ser suficientemente restrictivo para permitir el empaquetamiento sólo de PAV/vectores mínimos. Las mutaciones propuestas en la señal de empaquetamiento disminuyen el empaquetamiento, pero no proporcionan un bloque absoluto ya que se requiere la misma actividad de empaquetamiento para propagar el virus coadyuvante. Asimismo ni un incremento del tamaño del virus coadyuvante ni la mutación del gen de la proteína IX asegurarán que el PAV es empaquetado exclusivamente. Así, es improbable que el método descrito en WO 94/12649 sea útil para la producción de soluciones de partida libres de coadyuvante de vectores de adenovirus mínimos/PAV.

## 35 Referencias

- Berk**, A. J. (1986): *Ann. Rev. genet.* 20, 43-79.
- Bernards**, R., **Schrier**, P. I., **Bos**, J.L., and **Eb**, A.J. v. d. (1983): Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology* 127, 45-53.
- Bett**, A.J., **Prevec**, L., and **Graham**, F.L. (1993): Packaging Capacity and Stability of Human Adenovirus Type-5 Vectors. *J. Virol* 67, 5911-5921.
- Blaese**, M., **Blankenstein**, T., **Brenner**, M., **Cohen-Haguener**, O., **Gansbacher**, B., **Russell**, S., **Sorrentino**, B., and **Velu**, T. (1995). Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther.* 2, 291-297.
- Boshart**, M., **Weber**, F., **Jahn**, G., **Dorsch-Häler**, K., **Fleckenstein**, B., and **Scaffner**, W. (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human Cytomegalovirus. *Cell* 41, 521-530.
- Bout**, A., **Imler**, J.L., **Schulz**, H., **Perricaudet**, M., **Zurcher**, C., **Herbrink**, P., **Valerio**, D., and **Pavirani**, A. (1994a): *In vivo* adenovirus-mediated transfer of human CFTR cDNA to Rhesus monkey airway epithelium: efficacy, toxicity and safety. *Gene Therapy*, 1, 365-394.
- Bout**, A., **Perricaudet**, 14., **Baskin**, G., **Imler**, J. L., **Scholte**, S.J., **Pavirani**, A., and **Valerio**, D. 1994b): Lung gene therapy: *in vivo* adenovirus mediated gene transfer to rhesus monkey airway epithelium. *Human Gene Therapy* 5, 3-10.
- Brody**, S.L., and **Crystal**, RG. (1994): Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer. *Ann N Y Acad Sci* 716, 90-101.
- Brough**, D.E., **Gleghon**, V., and **Klessig**, D.F. (1992). Construction, characterization, and utilization of cell lines which inducibly express the adenovirus DNA-binding protein. *Virology* 190(2), 624-34.
- Brough**, D.E., **Rice**, S.A., **Sell**, S., and **Klessig**, D.F. (1985): Restricted changes in the adenovirus DNA-binding protein that lead to extended host range or temperature sensitive phenotypes. *J. Virol.* 55, 206-212.
- Daniell**, E. (1976): Genome structure of incomplete particles of adenovirus *J. Virol.* 19, 685-708.

## ES 2 231 813 T3

**Elsen, P.J.V. d., Houweling, A., and Eb, A. J.V. d. (1983).** Expression of region E1B of human adenoviruses in the absence of region E1A is not sufficient for complete transformation. *Virology* 128, 377-390.

5 **Engelhardt, J.F., Litzky, L., and Wilson, J.M. (1994a):** Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2A. *Hum. Gene Ther.* 5, 1217-1229.

**Engelhardt, J.F., Simon, R.H., Yang, Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Doranz, B., Grossman, M., and Wilson, J.M. (1993):** Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study. *Human Gene Therapy* 4, 759-769.

10 **Engelhardt, J.F., Ye, X., Doranz, B., and Wilson, J.M. (1994b):** Ablation of E2A in recombinant adenoviruses Improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 91, 6196-200.

15 **Fang, B., Wang, H., Gordon, G., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., Woo, S.L.C., and Eisensmith, R.C. (1996).** Lack of persistence of E1-recombinant adenoviral vectors containing a temperature sensitive E2A mutation in immunocompetent mice and hemophilia dogs. *Gene Ther.* 3, 217-222.

20 **Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Ormond, H. v., Hoeben, R.C., and Eb, A.J. v.d. (1996).** Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early-region-1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7, 215-222.

25 **Gooding, L.R., Aquino, L., Duerksen-Hughes, P.J., Day, D., Horton, T.M., Yei, S., and Wold, W.S.M. (1991):** The E1B 19000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytolysis of human cells but not of mouse cells. *J. Virol.* 65, 3083-3094.

**Gräble, M., and Hearing, P. (1990):** Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant. *J. Virol.* 64, 2047-2056.

30 **Gräble, M., and Hearing, P. (1992):** cis and trans Requirements for the Selective Packaging of Adenovirus Type-5 DNA. *J Virol* 66, 723-731.

**Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973).** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.

35 **Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977):** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.

40 **Haddada, H., Ragot, T., Cordier, L., Duffour, M.T., and Perricaudet, M. (1993):** Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces anritumoral immunity in mice. *Hum Gene Ther* 4, 703-11.

45 **Hay, R.T., Stow, N.D., and McDougall, I.M. (1984):** Replication of adenovirus minichromosomes. *J. Mol. Biol.* 174, 493-510.

**Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L., and Shenk, T. (1987):** Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.* 61, 2555-2558.

50 **Horwitz, M.S. (1990):** Adenoviridae and their replication, pp. 1679-1740. In B.N. Fields, and D.M. Knipe (Eds): *Virology*, Raven Press, Ltd, New York.

**Hu, C.H., Xu, F.Y., Wang, K., Pearson, A.N., and Pearson, G.D. (1992):** Symmetrical Adenovirus Minichromosomes Have Hairpin Replication Intermediates. *Gene* 110, 145-150.

55 **Imier, J.L., Chartier, C., Dreyer, D., Dieterle, A., Sainte-Marie, 14., Faure, T., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996).** Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther.* 3, 75-84.

60 **Jochemsen, A.G., Peltenburg, L.T.C., Pas, M.F.W.T., Wit, C.M. d., Bos, J.L., and Eb, A.J. v.d. (1987):** *EMBO J.* 6, 3399-3405.

**Klessig, D.F., and Grodzicker, T. (1979):** Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells maps in the viral gene encoding the 72K DNA-binding protein. *Cell* 17, 957-966.

65 **Klessig, D.F., Grodzicker, T., and Cleghon, V. (1984):** Construction of human cell lines which contain andexpress the adenovirus DNA binding protein gene by cotransformation with the HSV-1 tk gene. *Virus Res.* 1, 169-188.

**Kruijer, W., Nicolas, J.C., Schaik, F.M. v., and Sussenbach, J.S. (1983):** Structure and function of DNA binding

## ES 2 231 813 T3

- proteins from revertants of adenovirus type 5 mutants with a temperature-sensitive DNA replication. *Virology* 124, 425-433.
- 5 **Lechner, R.L., and Kelly Jr., T.J. (1977):** The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 174, 493-510.
- Leij, L. de, Postmus, P.E., Buys, C.H.C.M., Elema, J.D., Ramaekers, F., Poppema, S., Brouwer, M., Veen, A.Y. v.d., Mesander, G., and The, T.H. (1985):** Characterization of three new variant type cell lines derived from small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 45, 6024-6033.
- 10 **Leverero, M., Barban, V., Manteca, S., Ballay, A., Balsamo, C., Avantaggiati, M.L., Natoli, G., Skellekens, H., Tiollais, P., and Perricaudet, M. (1991):** Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes *in vitro* and *in vivo*. *Gene* 101, 195-202.
- 15 **Lochmüller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S., Simoneau, M., Massie, B., Karpati, G., and Acsadi, G. (1994):** Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants ( $\Delta E1 + \Delta E3$ ) during multiple passages in 293 cells. *Hum. Gene Ther.* 5, 1485-1492.
- 20 **Matsui T. Murayama M., and Mita T. (1986)** Adenovirus 2 peptide IX is expressed only in replicated DNA molecules. *Mol. Cell Biol.* 6, 4149-4154.
- Michelson, A.M., Markham, A.F., and Orkin, S.H. (1983):** Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X-chromosome encoded phosphoglycerate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 472-476.
- 25 **Morin, J.E., Lubeck, M.D., Barton, J. E., Conley, A.J., Davis, A.R., and Hung, P.P. (1987):** Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4626-4630.
- 30 **Nicolas, J.C., Suarez, F., Levine, A.J., and Girard, M. (1981):** Temperature-independent revertants of adenovirus H5ts125 and H5ts107 mutants in the DNA binding protein: isolation of a new class of host range temperature conditional revertants. *Virology* 108, 521-524.
- Ostrove, J.M. (1994):** Safety testing programs for gene therapy viral vectors. *Cancer Gene Ther.* 1, 125-131.
- 35 **Pacini, D.L., Dubovi, E.J., and Clyde, W.A. (1984):** *J. Infect. Dis.* 150, 92-97.
- Postmus, P.S., Ley, L.d., Veen, A.Y. v.d., Mesander, G., Buys, C.H.C.M., and Elema, J.D. (1988):** Two small cell lung cancer cell lines established from rigid bronchoscope biopsies. *Fur. J. Clin. Oncol.* 24, 753-763.
- 40 **Rice, S.A., and Klessig, D.F. (1985):** Isolation and analysis of adenovirus type 5 mutants containing deletions in the gene encoding the DNA-binding protein. *J. Virol.* 56, 767-778.
- Roberts, B.E., Miller, J.S., Kimelman D., Cepko, C.L., Lemischka, I.R., and Mulligan, R. C. (1985):** *J. Virol.* 56, 404-413.
- 45 **Shapiro, D.L., Nardone, L.L., Roonev, S.A., Motoyama, E.K. and Munoz, J.L. (1978).** Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 197-207.
- 50 **Simon, R. H., Engelhardt, J.F., Yang Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Grossman, M. and Wilson, J.M. (1993):** Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Human Gene Therapy* 4, 771-780.
- 55 **Singer-Sam, J., Keith, D.H., Tani, K., Simmer, R.L., Shively L., Lindsay, S. Yoshida, A. and Riggs, A.D. (1984):** Sequence of the promoter region of the gene for X-linked 3-phosphoglycerate kinase. *Gene* 32, 409-417.
- Stein, R.W., and Whelan, J. (1989):** Insulin gene enhancer activity is inhibited by adenovirus 5 E1A gene products. *Mol Cell Biol* 9, 4531-4.
- 60 **Stratford-Perricaudet, L.D., and Perricaudet, M. (1991):** Gene transfer into animals: the promise of adenovirus, pp. 51-61. In O. Cohen-Adenauer and M. Boiron (Lds): *Human Gene Transfer*, John Libbey Eurotext.
- 65 **Tellina, G.C., Perera, S., Szatkowsky, O.M., and Williams, J. (1994):** Absence of an essential regulatory influence of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein on viral growth and early gene expression in human dioloid W138, HeLa, and A549 cells. *J. Virol* 68, 541-7.
- Tooze, J. (1981):** *DNA Tumor Viruses* (revised). Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Vieira, J., and Messing, J. (1987): Production of single stranded plasmid DNA, pp. 3-11: *Methods in Enzymology*, Acad. Press Inc.

## ES 2 231 813 T3

**Vincent, A.J.P.E., Esandi, M. d. C., Someren, G.D. v., Noteboom, J.L., C.J.J, A., Vecht, C., Smitt, P.A.E.S., Bekkum, D.W. v., Valerio, D., Hoogerbrugge, PM., and Bout, A. (1996a).** Treatment of Lepto-meningeal metastasis in a rat model using a recombinant adenovirus containing the HSV-tk gene. *J. Neurosurg.* in press.

5 **Vincent, A.J.P.E., Vogels, R., Someren, G. v., Esandi, M. d. C., Noteboom, J.L., Avezaar, C.J.J., Vecht, C., Bekkum, D.W. v., Valerio, D., Bout, A., and Hoogerbrugge, P.M. (1996b).** Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase gene therapy for rat malignant brain tumors. *Hum. Gene Ther.* 7, 197-205.

10 **Wang, K., and Pearson, G.D. (1985):** Adenovirus sequences required for replication *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 13, 5173-5187.

**White, E., Denton, A., and Stillman, B. (1988):** *J. Virol.* 62, 3445-3454.

15 **Yanq, Y., Li, Q., Ertl, H.C.J., and Wilson, J.M. (1995):** Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* 69, 2004-2015.

**Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., and Wilson, J.M. (1994a):** Cellular immunity to viral antigens limits El-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-11.

20 **Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Gonczol, E., Engelhardt, J.F., and Wilson, J. M. (1994b):** Inactivation of E2A in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 7, 362-9.

25 **Zantema, A., Fransen, J.A.M., Davis-Olivier, A., Ramaekers, F.C.S., Vooijs, G.P., Deleys, B., y Eb. A.J. v.d. (1985).** Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* 142:44-58.

TABLA I

30 *Cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR de fragmentos de ADN utilizados para la generación de constructos descritos en esta solicitud de patente*

35	Ea-1	CGTGTAGTGTATTTATACCCG	Amplificación mediante PCR de nt459 de Ad5 ->
	Ea-2	TCGTCACTGGGTGGAAAGCCA	Amplificación mediante PCR de nt960 <-
40	Ea-3	TACCCGCCGTCCTAAATGGC	nt1284-1304 del genoma de Ad5
	Ea-5	TGGACTTGAGCTGTAAACGC	nt1514-1533 del genoma de Ad5
45	Ep-2	GCCTCCATGGAGGTCAGATGT	nt1721-1702 de Ad5; Introducción del sitio NcoI
	Eb-1	GCTTGAGCCCGAGACATGCT	Nt3269-3289 del genoma de Ad5
50	Eb-2	CCCCTCGAGCTCAATCTGTATCTT	nt3508-3496 del genoma de Ad5; introducción del sitio XhoI
55	SV40-1	GGGGGATCCGAACCTGTTTATTGCAGC	Introducción del sitio BamHI (nt2182-2199 de pMLP.TK) adaptación de adenovirus recombinantes
60	SV40-2	GGGAGATCTAGACATGATAAGATAC	Introducción del sitio BglII (nt2312-2297 de pMLP.TK)
	Ad5-1	GGGAGATCTGTACTGAAATGTGTGGGC	Introducción del sitio BglII (nt2496-2514 de pMLP.TK)
65	Ad5-2	GGAGGCTGCAGTCTCCAACGGCGT	nt2779-2756 de PMLP.TK

## ES 2 231 813 T3

TABLA I (continuación)

5	ITR1	GGGGGATCCTCAAATCGTCACTTCCGT	nt35737-35757 de Ad5 (introducción del sitio BamHI)
	ITR2	GGGGTCTAGACATCATCAATAATATAC	nt35935-35919 de Ad5 (introducción del sitio XbaI)
10	Grupos de cebadores de PCR que se van a utilizar para crear los sitios SalI y Asp718 yuxtapuestos a las secuencias ITR:		
	PCR/MLP1	GGCGAATTCGTCGACATCATCAATAATATACC	(Ad5 nt. 10-18)
15	PCR/MLP2	GGCGAATTCGGTACCATCATCAATAATATACC	(Ad5 nt. 10-18)
	PCR/MLP3	CTGTGTACACCGGCGCA	(Ad5 nt. 200-184)
20	El par de oligonucleótidos sintéticos utilizados para generar una horquilla sintética, recrea un sitio Asp718 en uno de los extremos si se inserta en el sitio Asp718:		
25	HP/asp1	5'-GTACACTGACCTAGTGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGGCACTAGGTCAG	
	HP/asp2	5'-GTACCTGACCTAGTGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCACTAGGTCAGT	
30	El par de oligonucleótidos sintéticos utilizados para generar un horquilla sintética, contiene el sitio de reconocimiento que se va a utilizar para la formación de la horquilla.		
	HP/c1a1	5'-GTACATTGACCTAGTGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGGCACTAGGTCAATCGAT	
35	HP/c1a2	5'-GTACATCGATTGACCTAGTGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCACTAGGTCAAT	

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA II

Célula	Número de Pases	IG.Ad.CMV.lacZ	IG.Ad.CMV.TK	IG.Ad.MLPI.TK d1313	Media de Producción
293		6,0	5,8	34	17,5
911		8	14	180	59,5
PER.C3	17	8	11	40	25,8
PER.C5	15	6	17	200	64,7
PER.C6	36	10	22	320	102

Rendimientos x  $10^{-8}$  pfu/matraz T175.

Tabla II.

23

Rendimientos de diferentes adenovirus recombinantes obtenidos tras la inoculación de líneas celulares de empaquetamiento de E1 de adenovirus 293, 911, PER.C3, PER.C5 y PER.C6. Los rendimientos son la media de dos experimentos diferentes.

IG.Ad.CMV.lacZ e IG.Ad.CMV.TK se describen en la solicitud de patente EP0707071.

La construcción de IG.Ad.MLPI.TK se describe en esta solicitud de patente.

Los rendimientos de virus por matraz T80 fueron determinados mediante análisis de placas en células 911, como se describe (Fallaux y col, 1996).

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de empaquetamiento que comprende:

5 una molécula de ácido nucleico recombinante basada en o derivada de adenovirus, teniendo dicha molécula de ácido nucleico una señal de encapsidación funcional y al menos una Repetición Terminal Invertida funcional o un fragmento funcional o un derivado del mismo, y

10 una célula de empaquetamiento, comprendiendo dicho ácido nucleico recombinante y dicha célula de empaquetamiento juntos todos los elementos que son necesarios para generar una partícula adenoviral recombinante que comprende dicha molécula de ácido nucleico recombinante, donde dicha molécula de ácido nucleico recombinante no tiene secuencias solapantes que permitan la recombinación homóloga que conduce a un virus de replicación competente en dicha célula de empaquetamiento.

15 2. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico es una forma lineal y comprende una Repetición Terminal Invertida en ambos extremos o cerca de ellos.

20 3. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico es una forma lineal y de hebra esencialmente sencilla y comprende en el extremo 3' una secuencia complementaria a una porción curso arriba de la misma hebra de dicha molécula de ácido nucleico, siendo capaz dicha secuencia de emparejar las bases con dicha porción de manera que sea capaz de funcionar como un sitio de partida para una polimerasa de ácido nucleico.

25 4. Un sistema de empaquetamiento que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante resultante de la acción de una polimerasa de ácido nucleico sobre una molécula de ácido nucleico formada por un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 3.

30 5. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 4, donde dicha molécula de ácido nucleico tiene una Repetición Terminal Invertida en ambos extremos.

6. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha célula de empaquetamiento comprende una molécula de ácido nucleico con una mutación de la gama de huésped.

35 7. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha célula de empaquetamiento comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una región E2 mutada haciendo al menos uno de sus productos sensible a la temperatura.

40 8. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha célula de empaquetamiento comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una región E2 bajo el control de un promotor inducible.

9. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha célula de empaquetamiento ha sido proporcionada con una o más moléculas de ácido nucleico de empaquetamiento que proporcionan a dicha célula la capacidad de expresar productos génicos adenovirales derivados al menos de la región E1A.

45 10. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 9, donde dichas una o más moléculas de ácido nucleico de empaquetamiento proporcionan adicionalmente a dicha célula la capacidad de expresar productos génicos adenovirales derivados de la región E2A.

50 11. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 10, donde la molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la región E2A está bajo el control de un promotor inducible.

55 12. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 10 u 11, donde la molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la región E2A está mutado de manera que al menos uno de sus productos sea sensible a la temperatura.

13. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 9, donde dicha célula de empaquetamiento no tiene la capacidad de expresar los productos de E1B.

60 14. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 13, donde la información genética que codifica los productos de E1B no está presente.

15. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 9, donde dicha célula de empaquetamiento comprende adicionalmente la región que codifica E1B.

65 16. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 9, donde dicha célula de empaquetamiento comprende adicionalmente un gen marcador.



## ES 2 231 813 T3

17. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 16, por medio del cual el gen marcador está bajo el control del promotor responsable de E1B.

5 18. Una célula de empaquetamiento que alberga un fragmento de ADN de un adenovirus, constando ese fragmento de los nucleótidos 80-5.788 del genoma del Adenovirus 5 humano.

19. Una célula de empaquetamiento que alberga un fragmento de ADN de un adenovirus, constando ese fragmento de los nucleótidos 459-1.713 del genoma del Adenovirus 5 humano.

10 20. Una célula de empaquetamiento que alberga un fragmento de ADN de un adenovirus, constando ese fragmento de los nucleótidos 459-3.510 del genoma del Adenovirus 5 humano.

21. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 9, donde dicha célula de empaquetamiento no tiene la capacidad de expresar el producto de E1B de 21 kD.

15 22. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 21, donde la información genética que codifica el producto E1B de 21 kD no está presente en dicha célula de empaquetamiento.

20 23. Un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-17, 21 ó 22, donde dicha célula de empaquetamiento es una célula diploide.

24. Un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-17 ó 21-23, donde dicha célula de empaquetamiento no es de origen humano.

25 25. Un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9-17 ó 21-24, donde dicha célula de empaquetamiento tiene su origen en el mono.

26. Una célula según la reivindicación 18 consignada con el núm. 95062101 en el ECACC.

30 27. Un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17 ó 21-25, donde dicha molécula de ácido nucleico recombinante es una molécula de ADN.

28. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico recombinante tiene al menos una delección de los nucleótidos 459-3.510 de la región E1.

35 29. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico recombinante tiene al menos una delección de los nucleótidos 459-1.713 de la región E1.

40 30. Un lote de partículas de adenovirus recombinante producido por un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, 21-25 ó 27-29, cuyo lote está libre de partículas de replicación competente.

31. Una célula que comprende un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, 21-25 ó 27-29.

45 32. Un sistema de empaquetamiento según una cualquiera de las reivindicación 1-3, donde dicha molécula de ácido nucleico comprende los genes E2A y E2B funcionales o fragmentos funcionales o derivados de los mismos bajo el control de un promotor independiente de E1A.

33. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 25, donde dicha célula de empaquetamiento comprende una región E2A de adenovirus mutada para la gama de huésped.

50 34. Una célula según la reivindicación 20 consignada con el núm. 96022940 en la ECACC.

55 35. Una célula de empaquetamiento para empaquetar adenovirus derivados de moléculas de ácido nucleico, a cuya célula de empaquetamiento se han proporcionado una o más moléculas de ácido nucleico de empaquetamiento, proporcionando dichas moléculas de ácido nucleico o las moléculas de ácido nucleico a dicha célula la capacidad de expresar productos génicos adenovirales derivados al menos tanto de la región de E1A como de la de E2A, donde la molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la región E2A es mutada de manera que al menos uno de sus productos es sensible a la temperatura.

60 36. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 1, donde el genoma de dicha célula de empaquetamiento comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas E1A y E1B adenovirales pero carece de las secuencias pIX.

65 37. Un sistema de empaquetamiento según la reivindicación 36, donde dicha célula de empaquetamiento es una célula PER.C6 consignada con el núm. 96022940 en la ECACC.

38. Una célula, **caracterizada** porque comprende en su genoma ácido nucleico que codifica las proteínas E1A y E1B adenovirales pero carece de secuencias pIX.

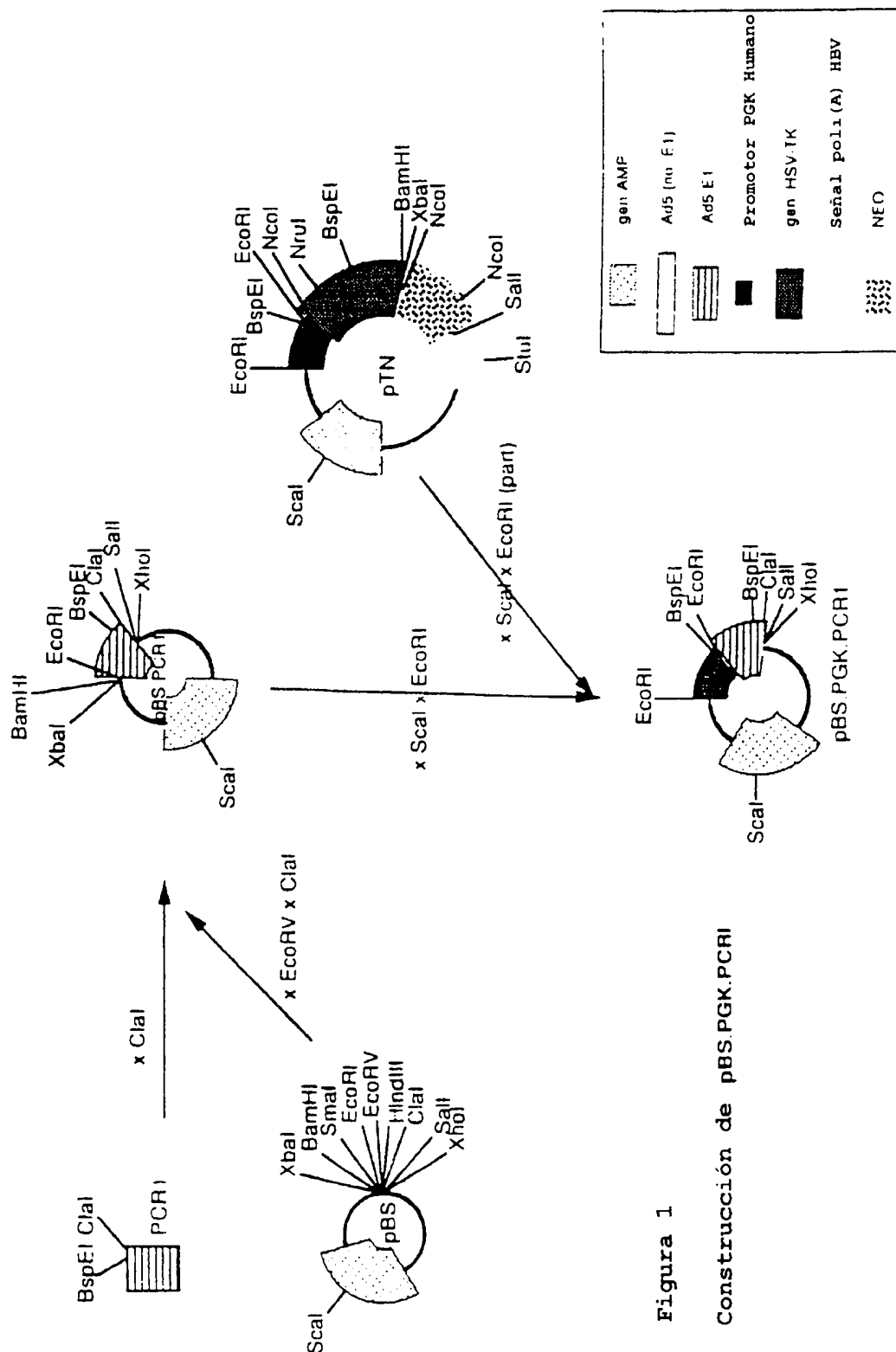


Figura 1

Construcción de pBS.PGK.PCR1

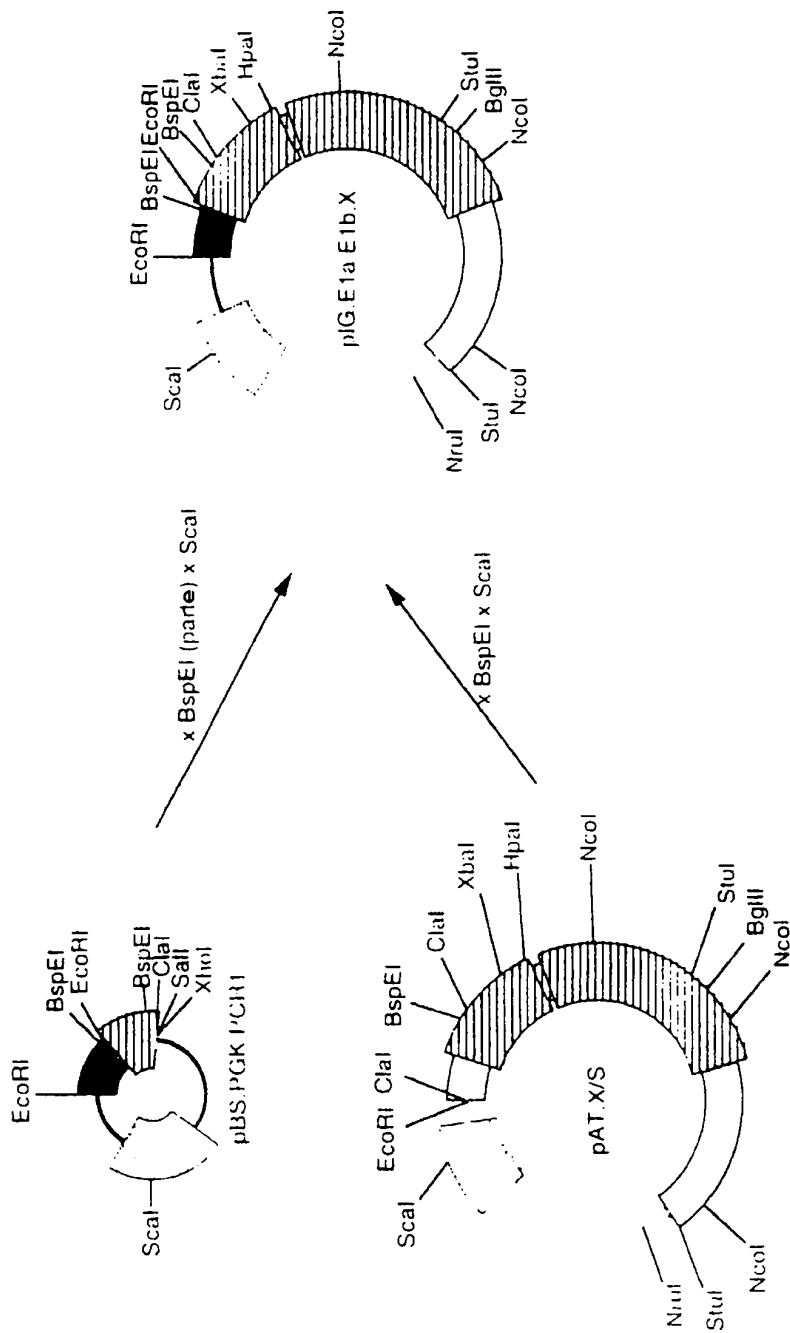


Figura 2

Construcción de pIG.E1a.E1b.X

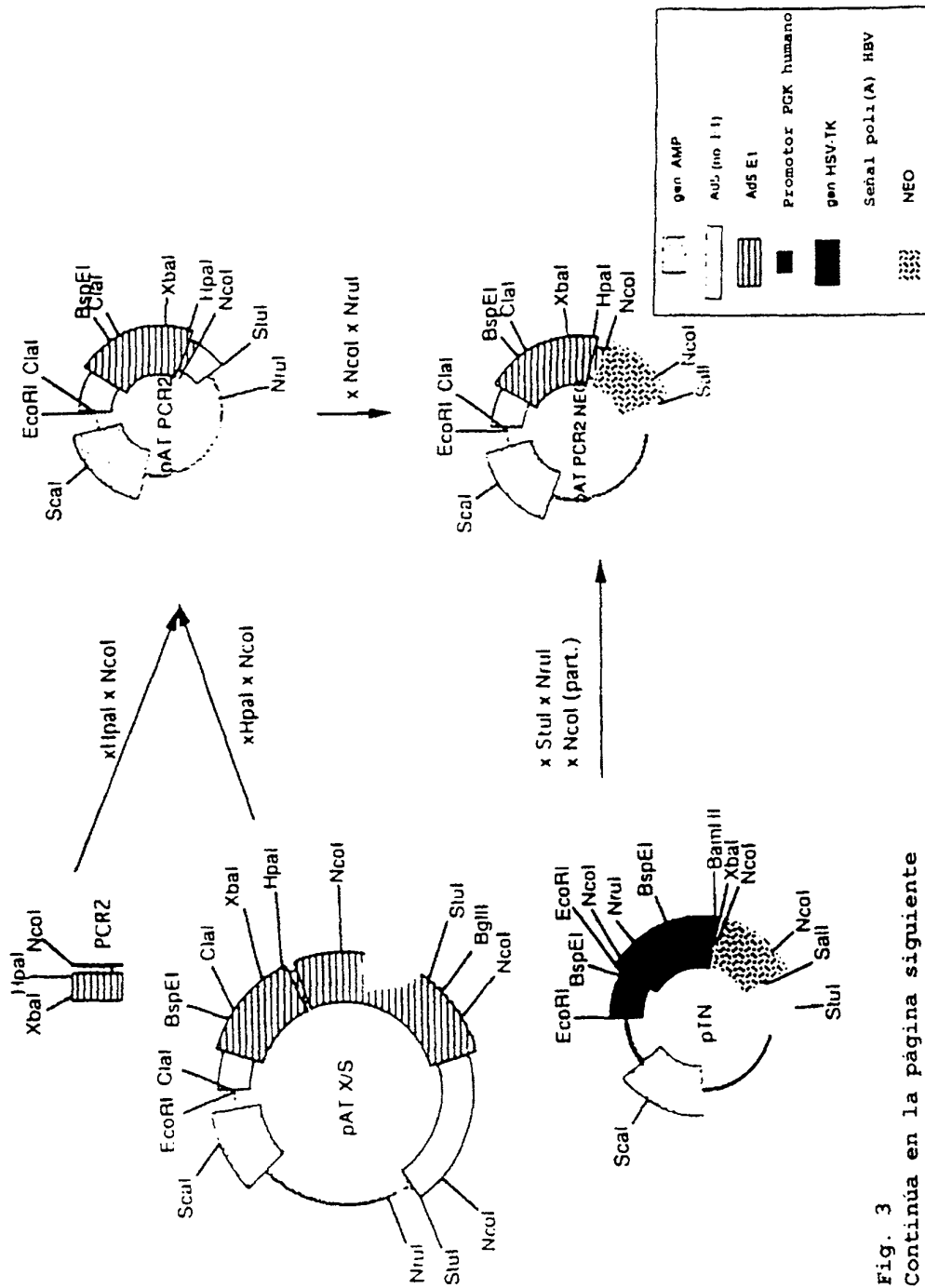


Fig. 3  
Continúa en la página siguiente

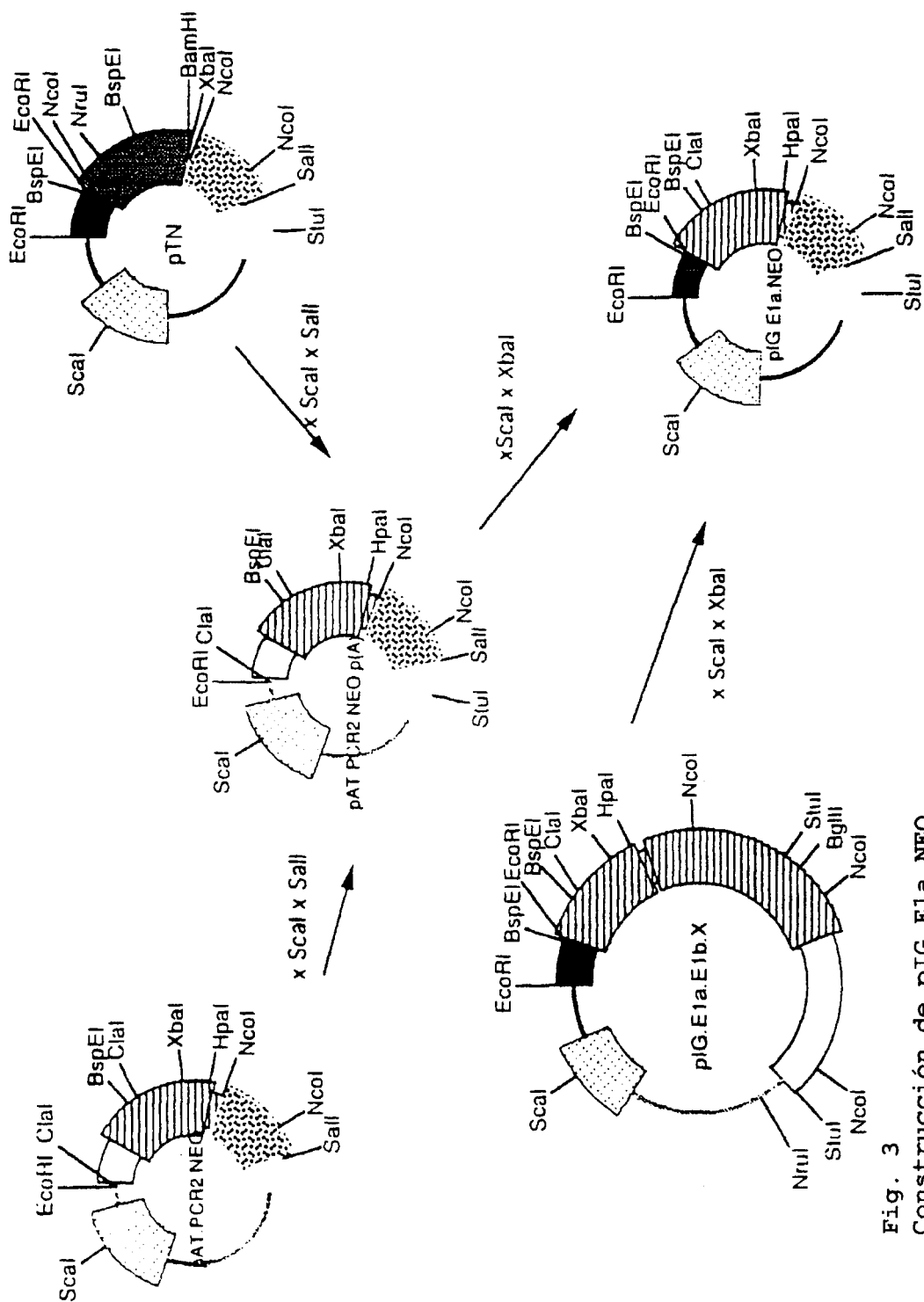


Fig. 3  
 Construcción de pIG.E1a.NEO

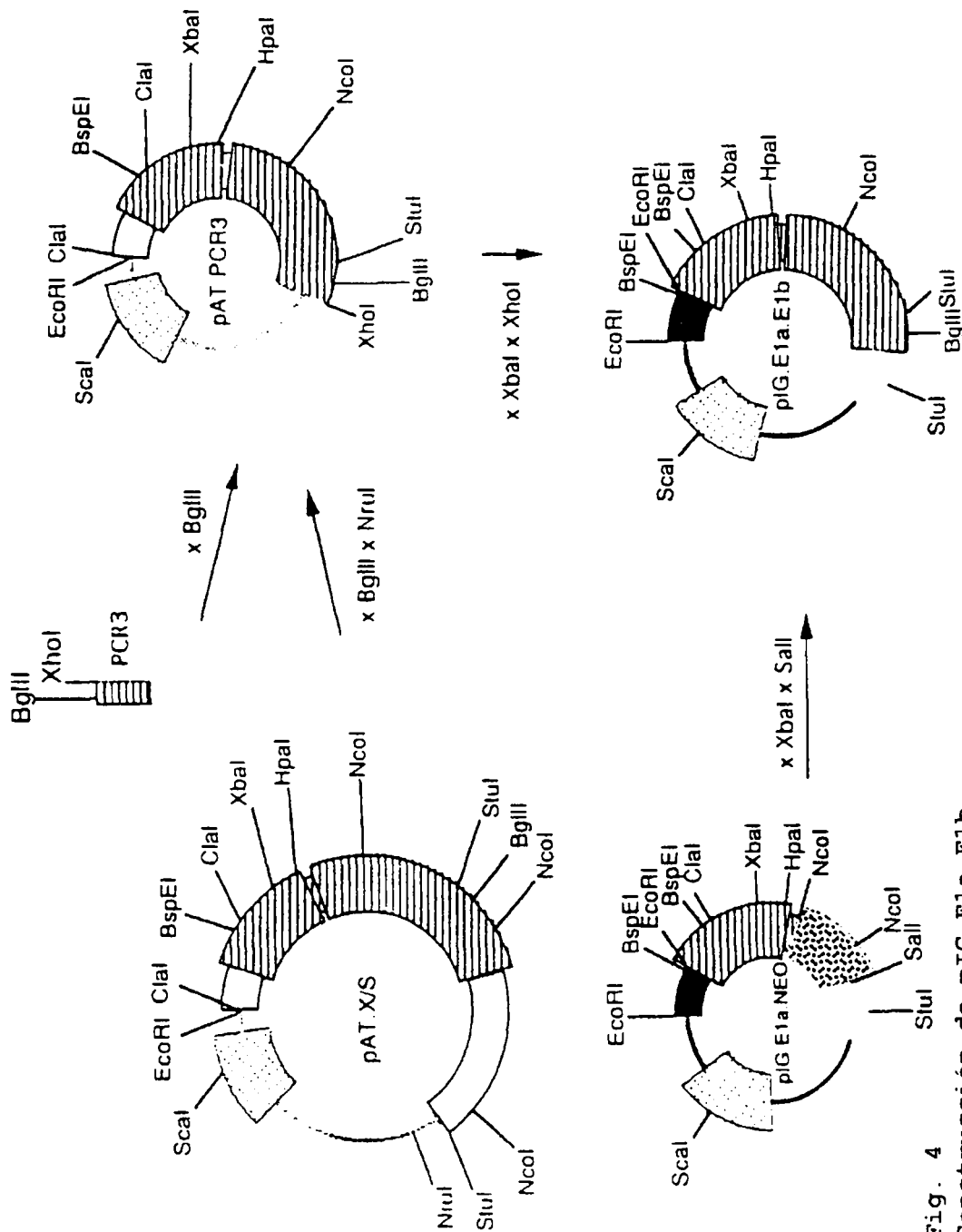
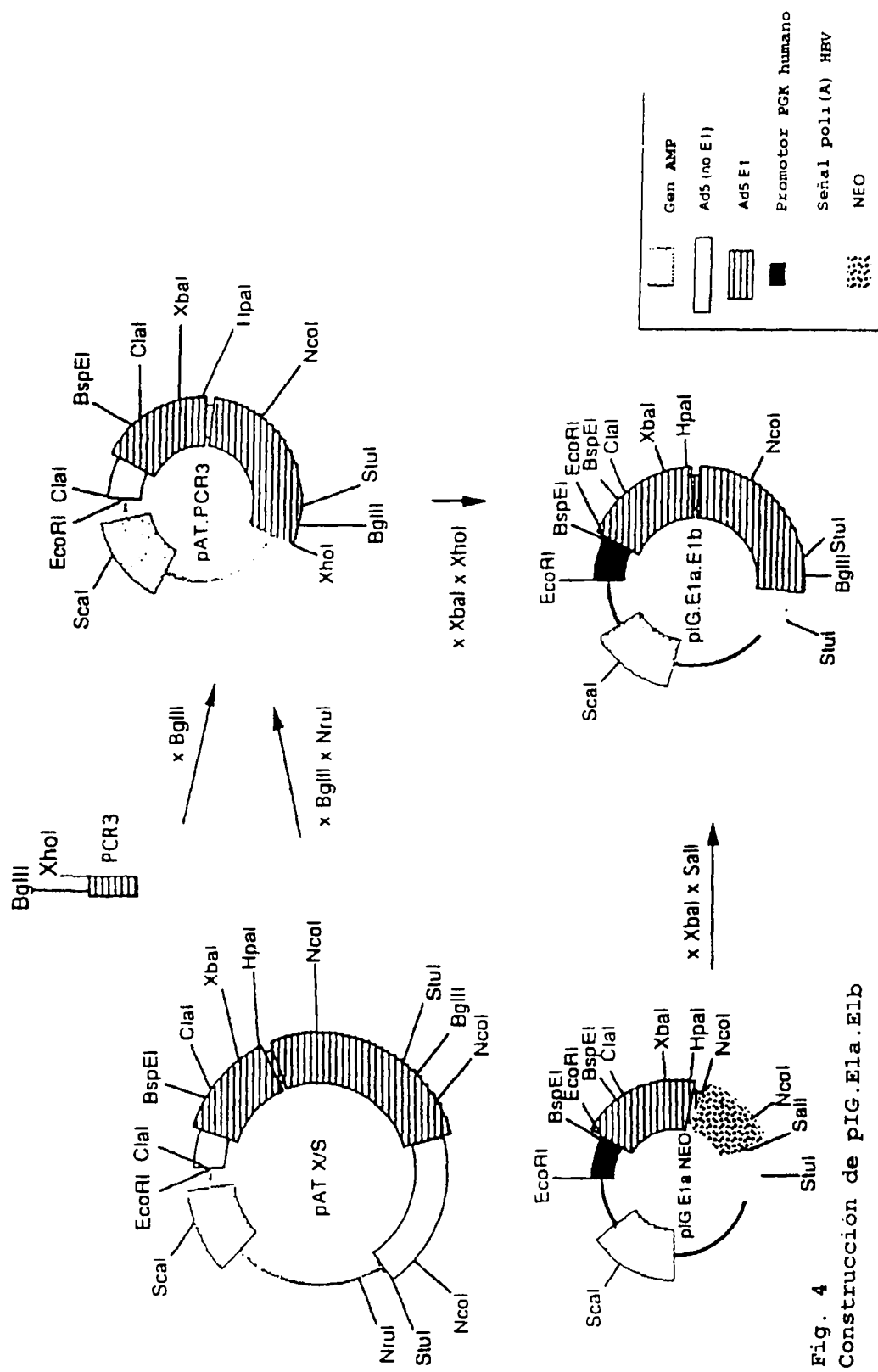


Fig. 4  
Construcción de pIG.E1a.E1b



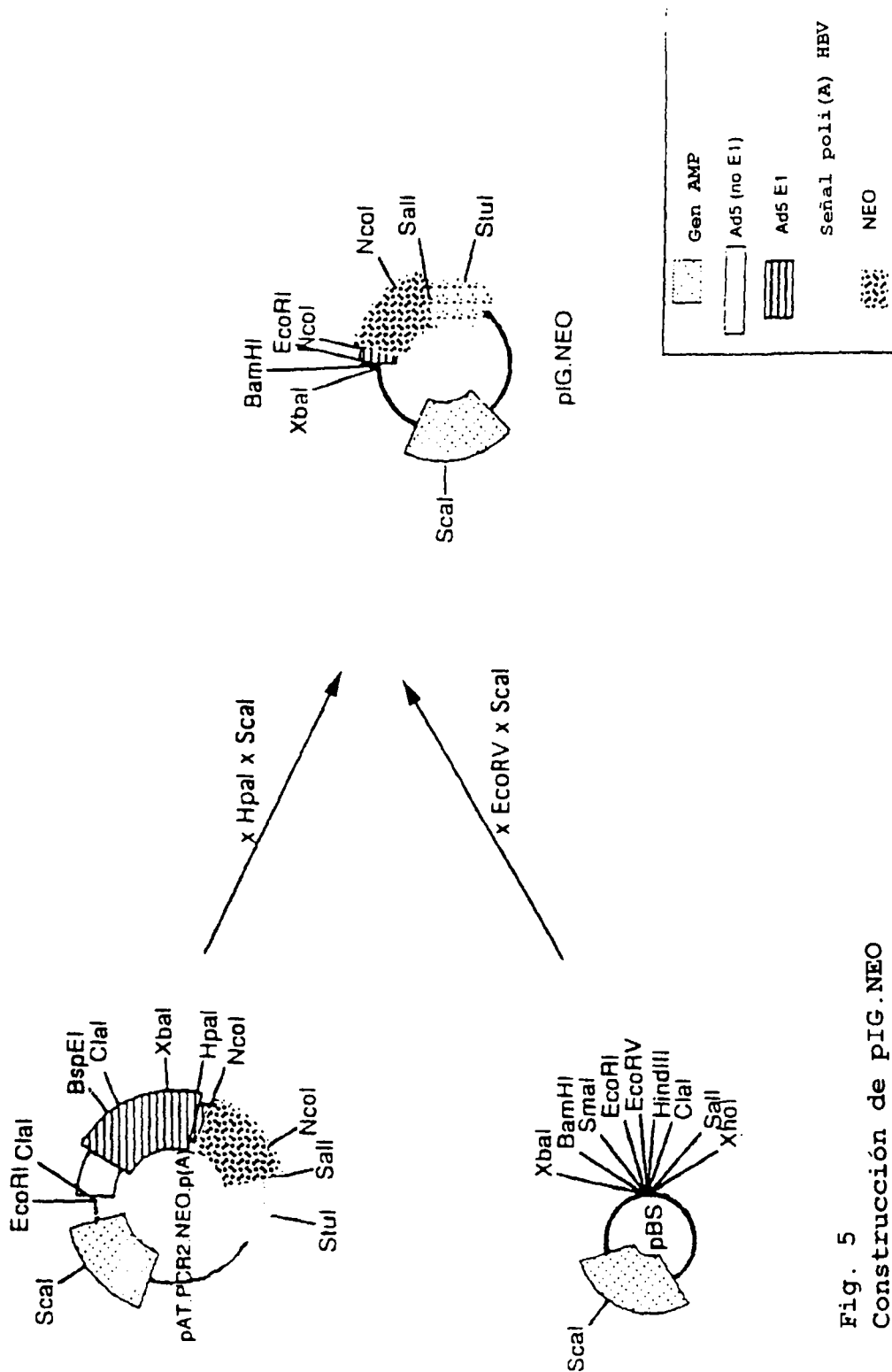
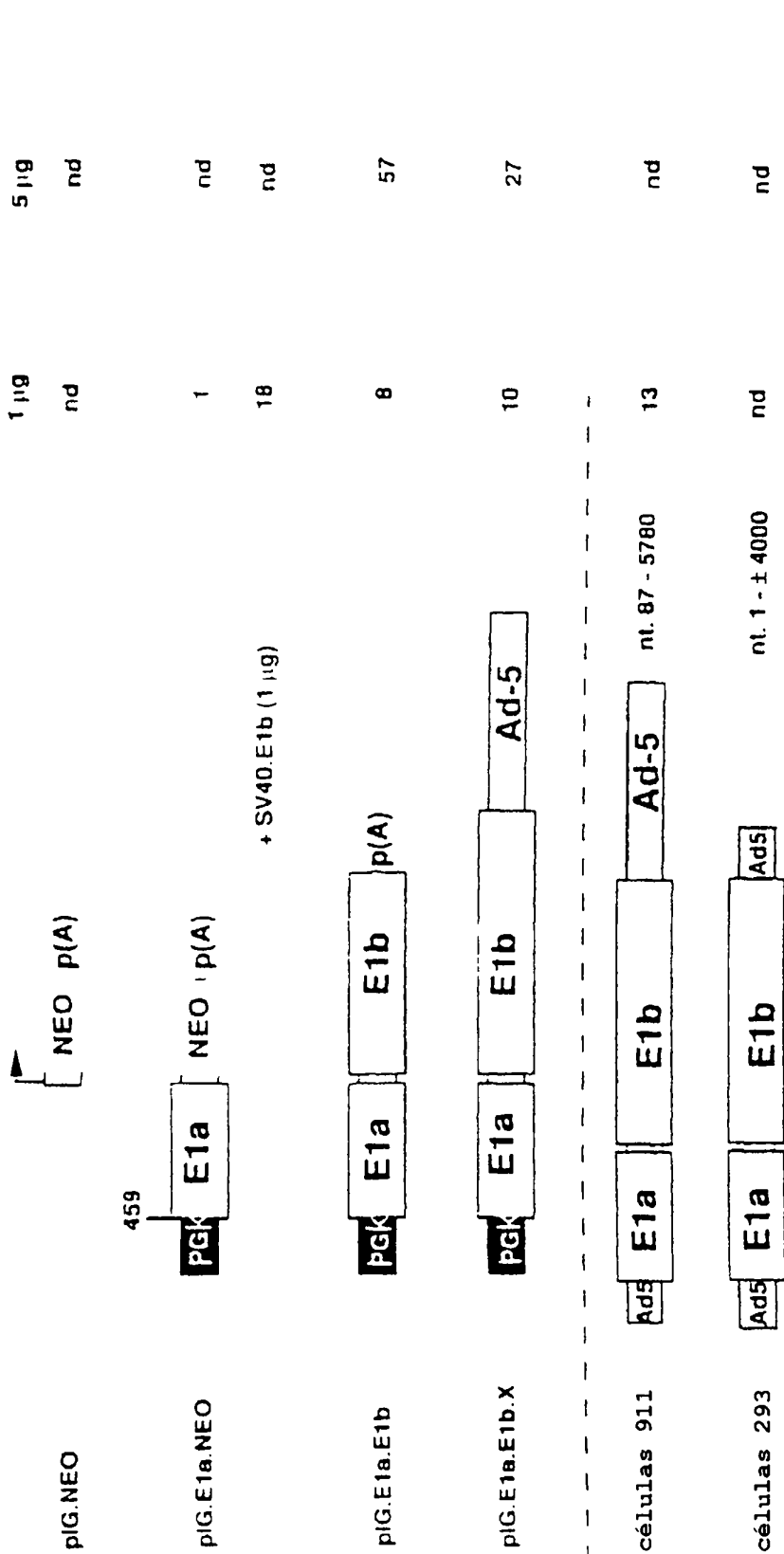


Fig. 5  
Construcción de pIG.NEO



transformación de células primarias de riñón\*

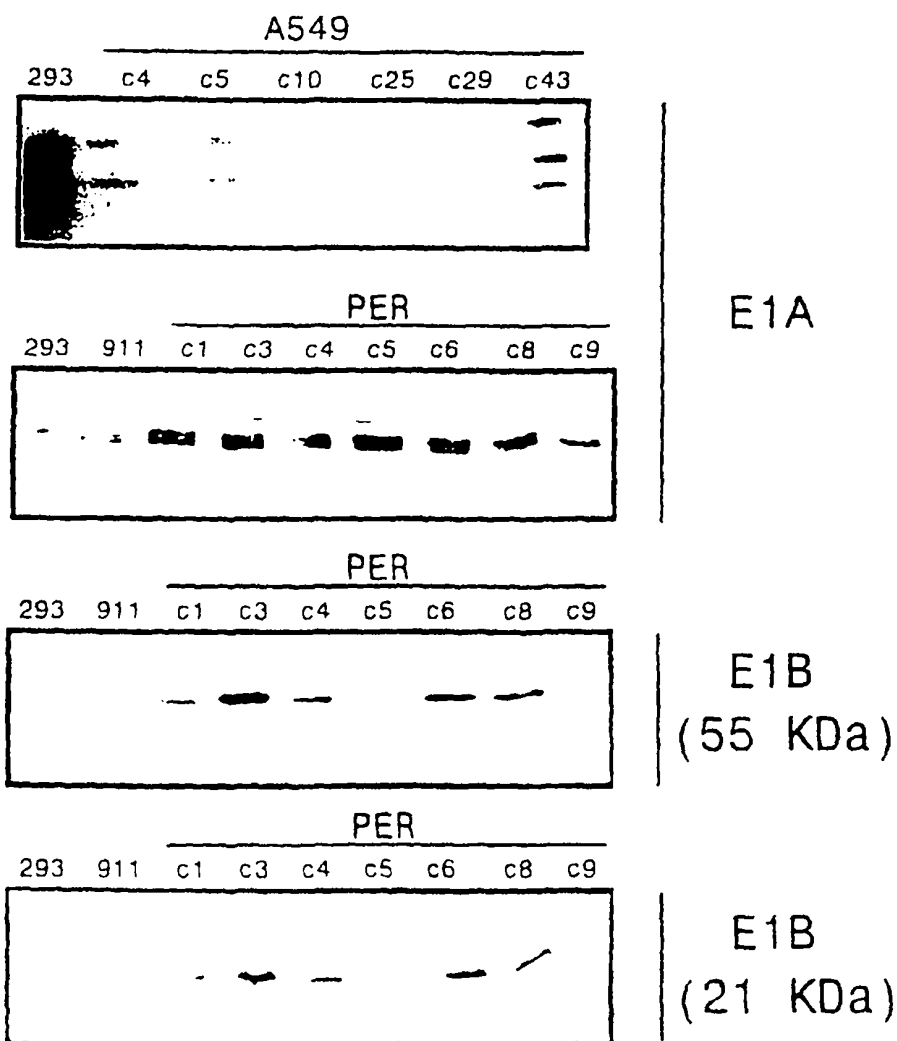


\* promedio de 5 placas 21 días después de la transfección

Figura 6  
Vista general de constructos de empaquetamiento de virus asequibles y evaluación de su capacidad para transformar células de riñón primarias

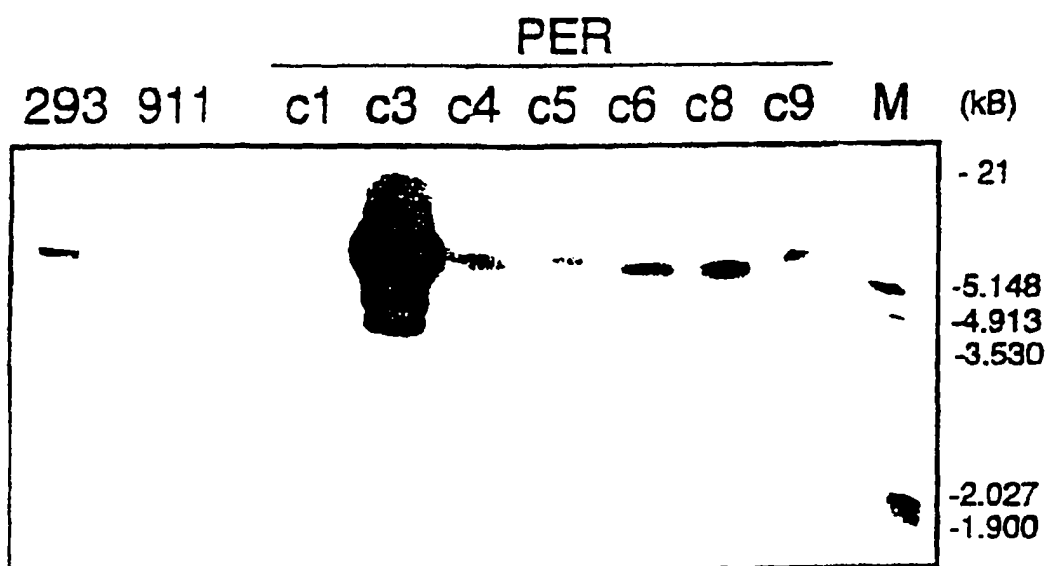
**Figura 7**

Análisis mediante transferencia Western de los clones de A549 transfectados con pIG.E1A.NEO y de los clones de PER (células HER transfectadas con pIG.E1A.E1B)



### Figura 8

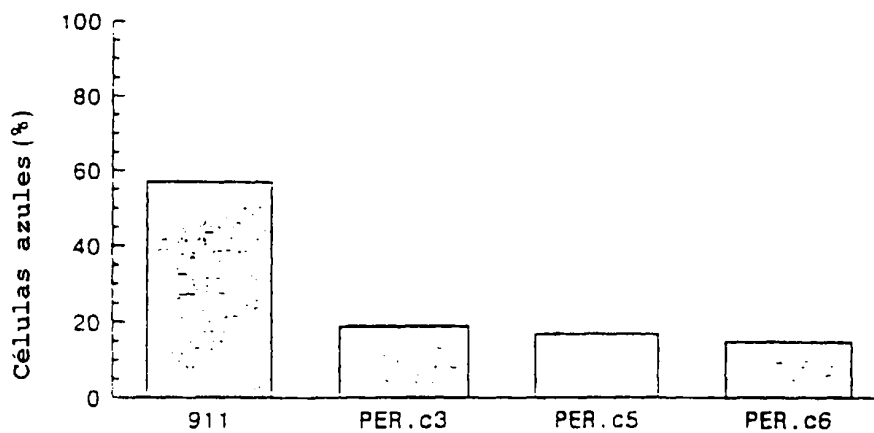
Análisis mediante transferencia Southern de las líneas celulares 293, 911 y PER



## Figura 9

Eficacia de la transfección de las células PER.C3, PER.C5, PER.C6 y 911.

Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos y transfectadas (n=2) con 5  $\mu$ g de pRSV.lacZ mediante coprecipitación con fosfato de calcio. Al cabo de 48 horas las células se tiñeron con X-GAL. Se muestra el porcentaje medio de células azules.



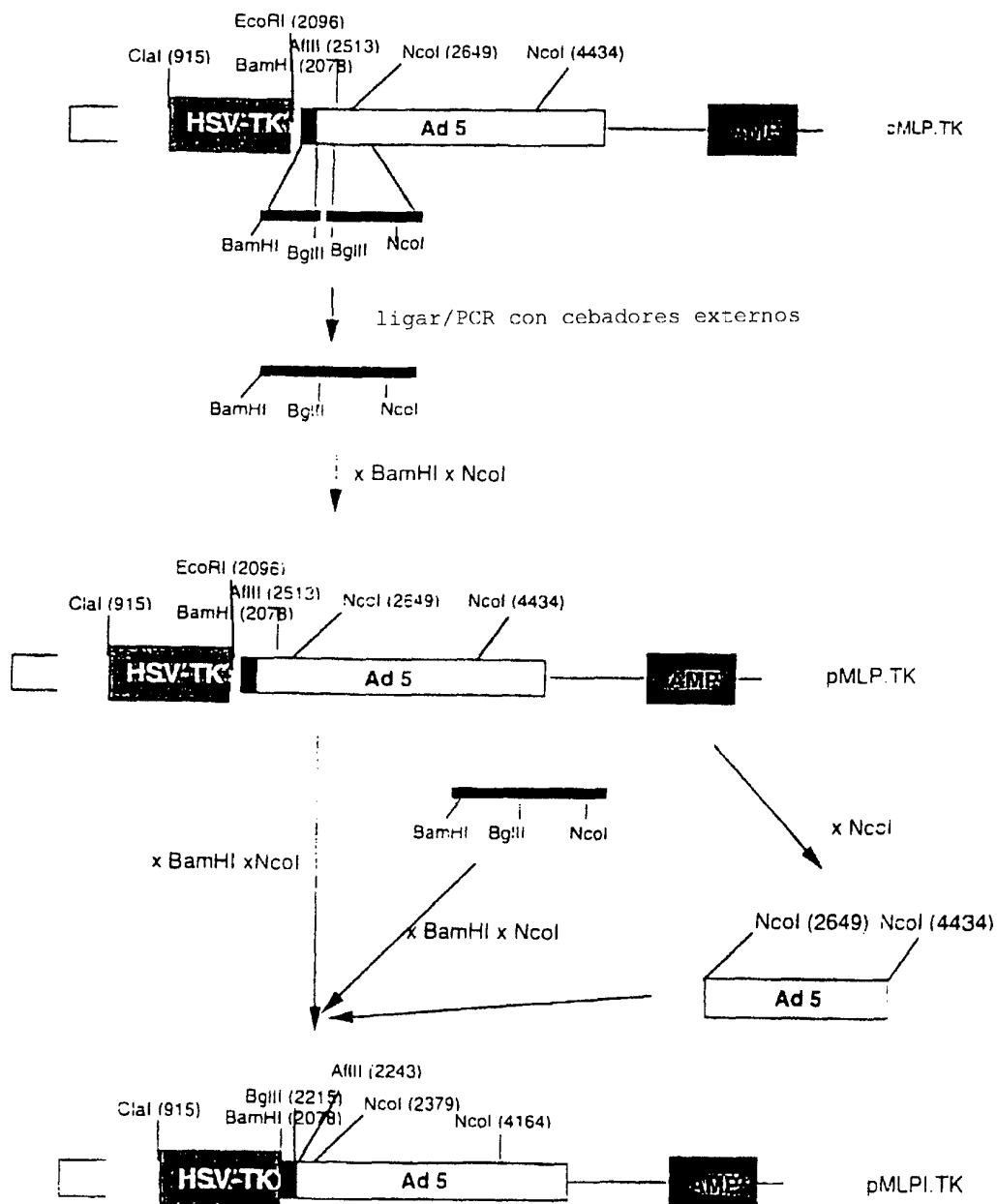


Figura 10.  
 Construcción de pMLPI.TK a partir de pMLP.TK

Nuevos adenovirus recombinantes y constructos de empaquetamiento  
sin solapamiento de la secuencia

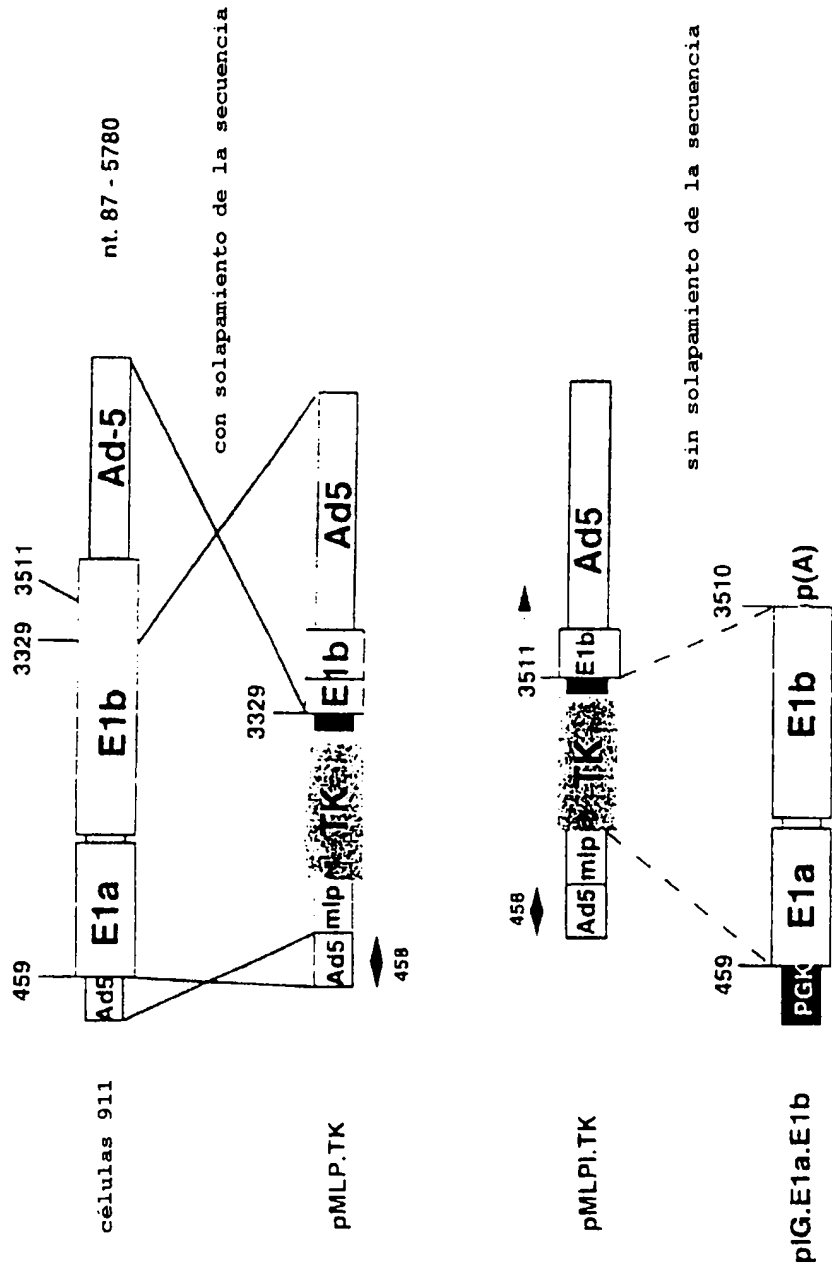


Figura 11a  
Sistema de empaquetamiento basado en células primarias

Nuevos adenovirus recombinantes y constructos de empaquetamiento sin solapamiento de la secuencia

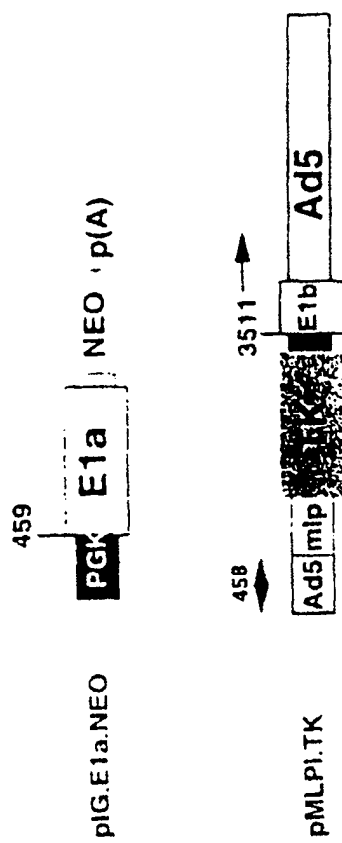


Figura 11b.  
 Sistema de empaquetamiento basado en líneas celulares establecidas: transfección con E1a y selección con G418

Generación de adenovirus recombinantes

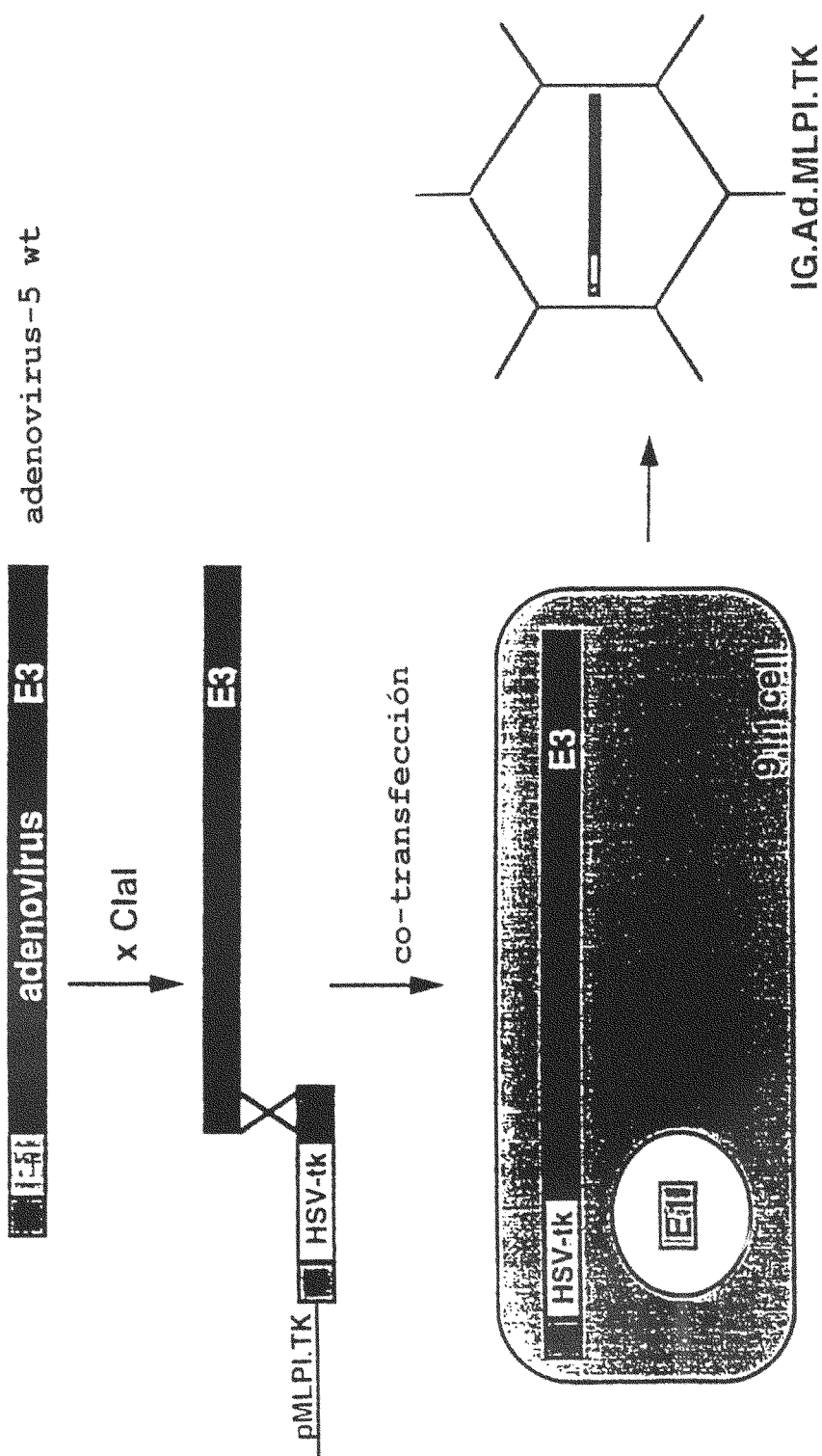


Figura 12



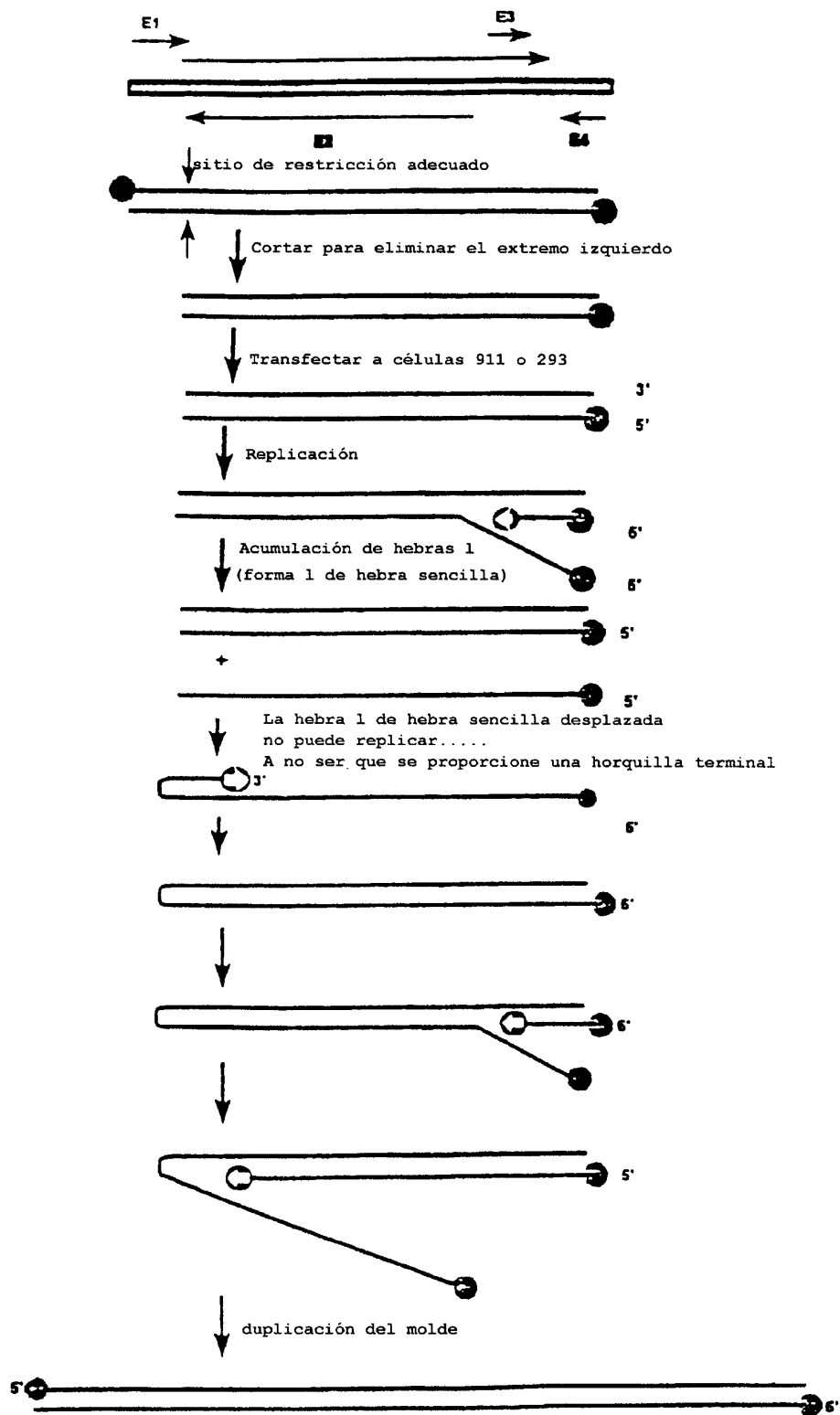


Figura 13

### Replicación de Adenovirus

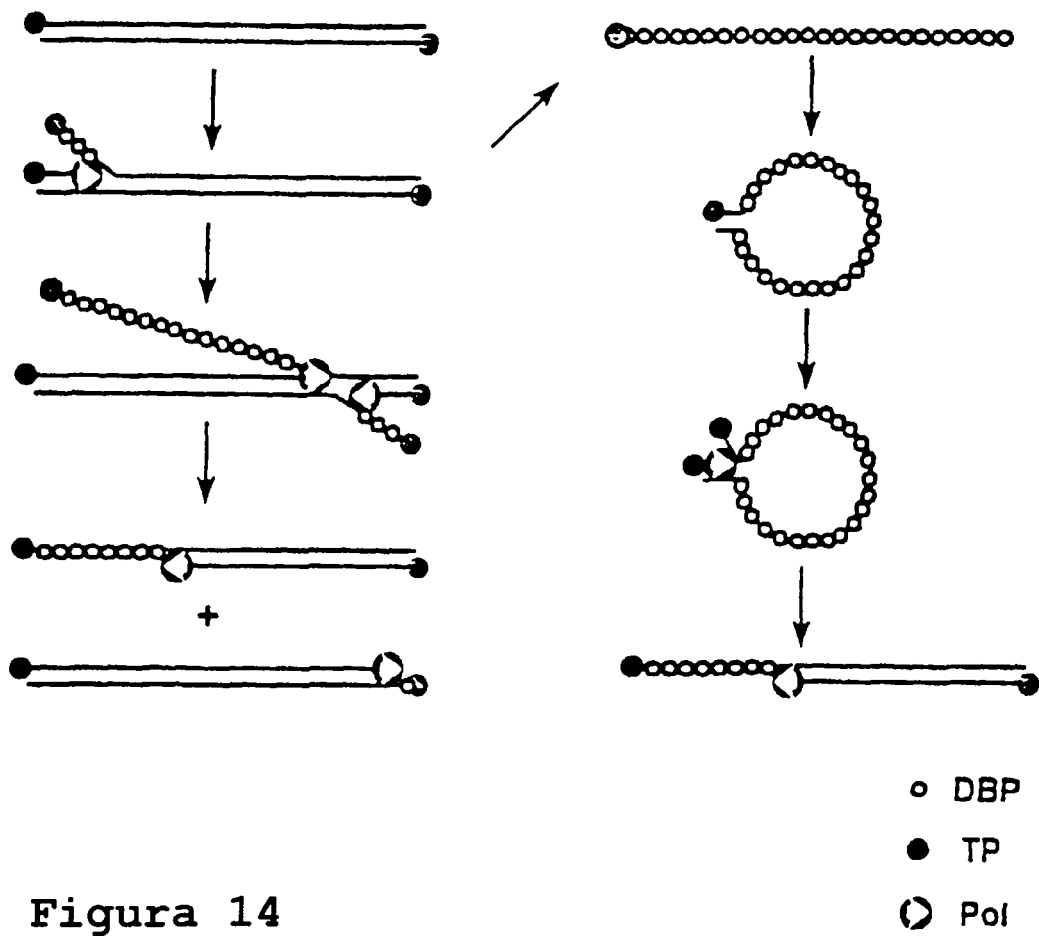


Figura 14



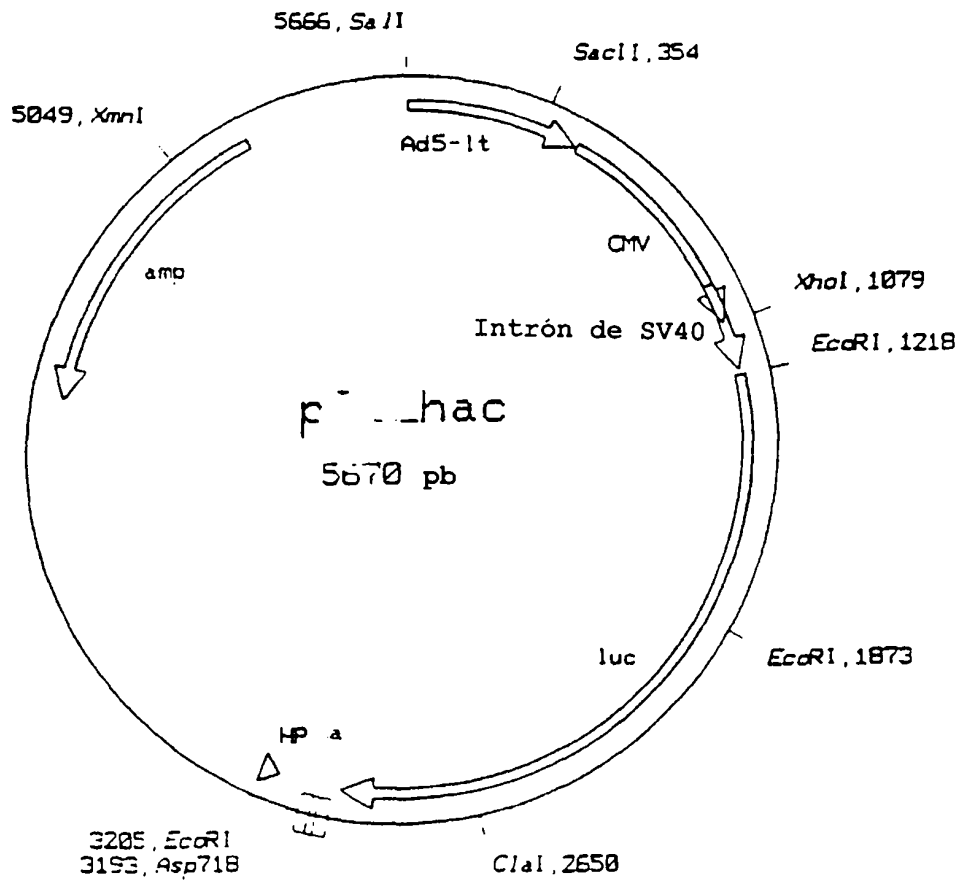


Figura 16

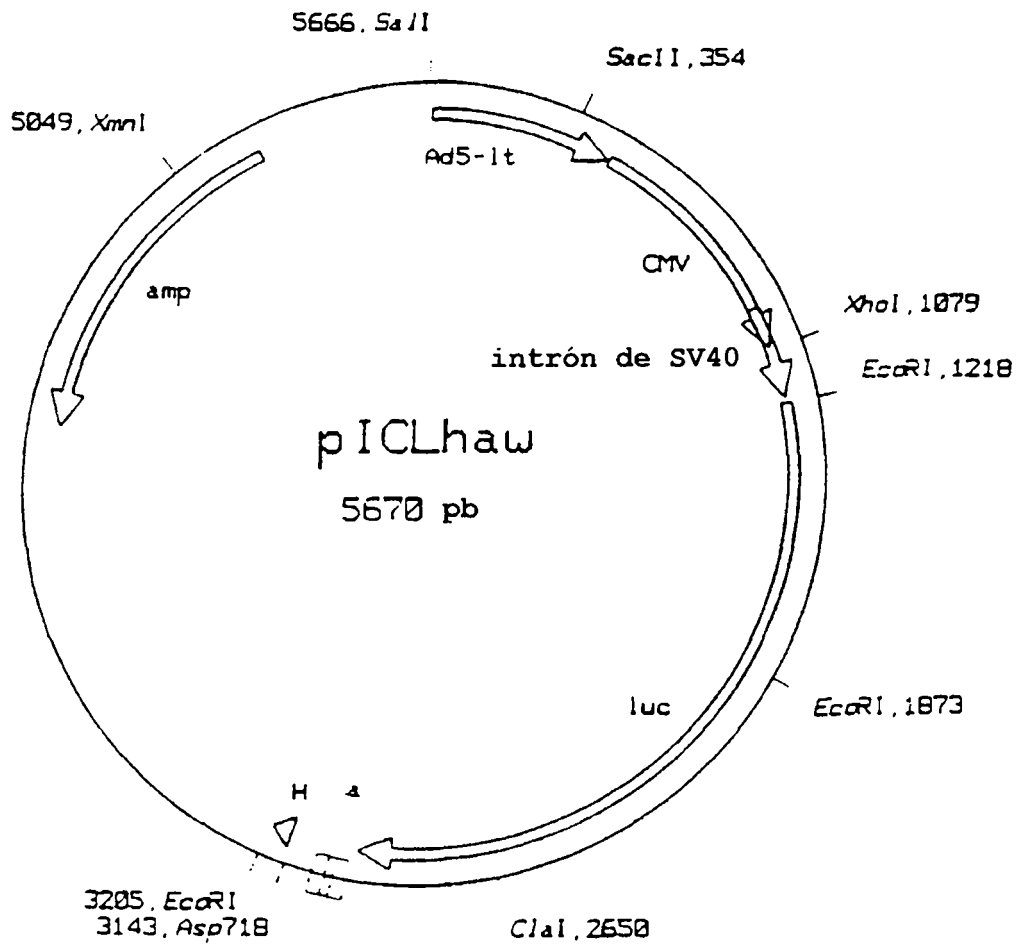


Figura 17

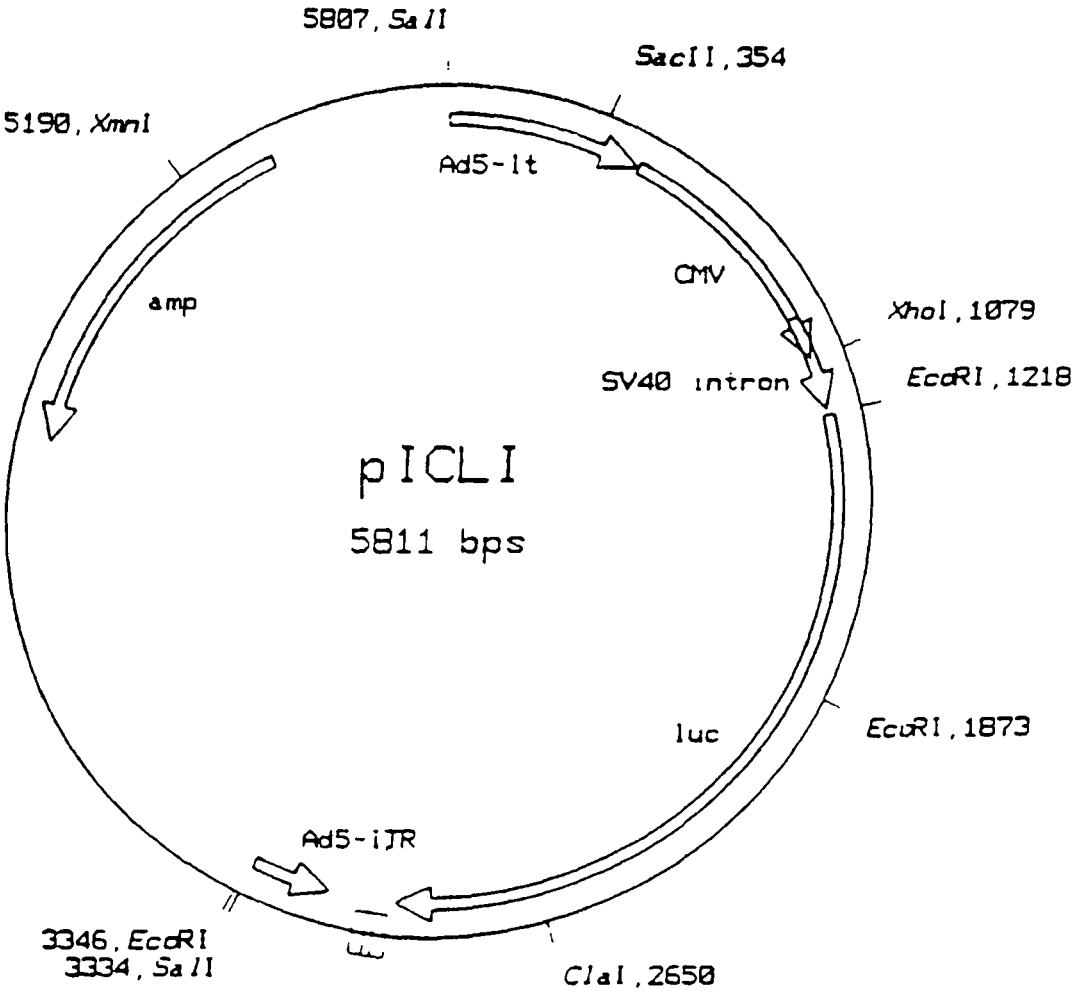


Figura 18

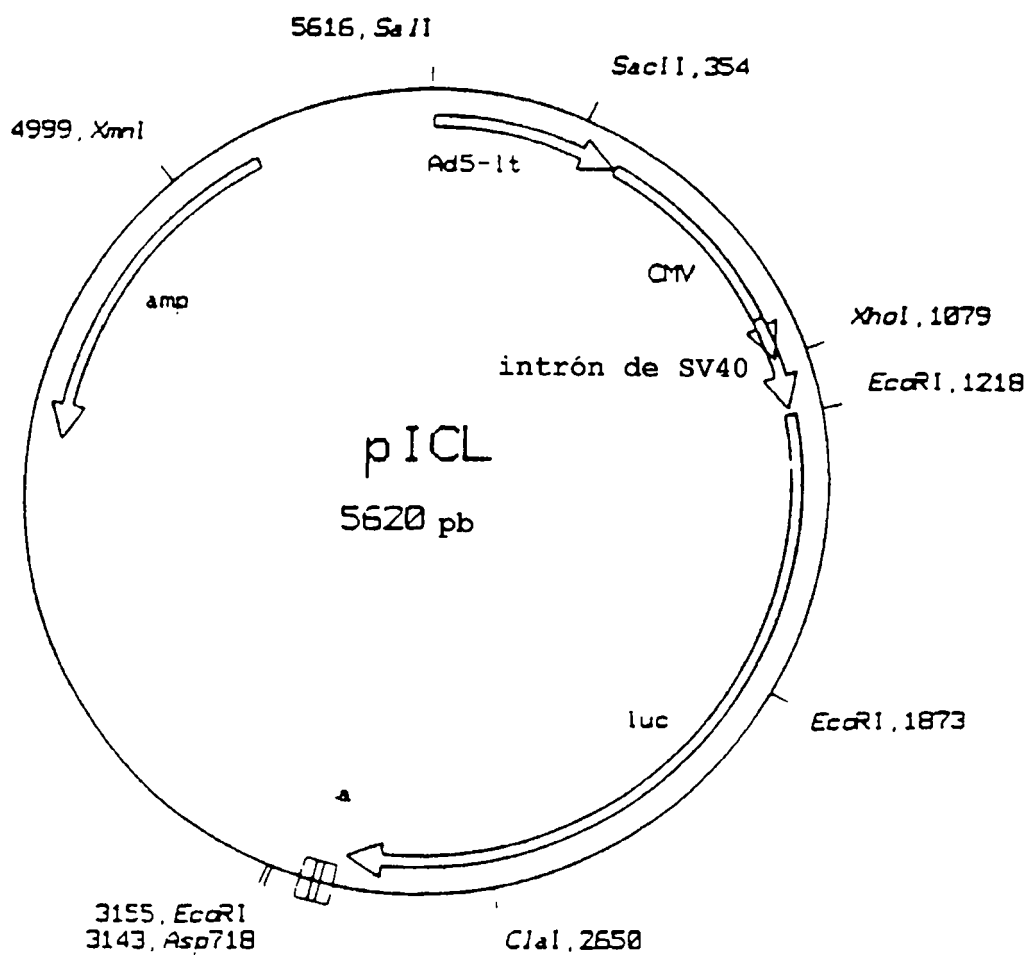


Figura 19

# ES 2 231 813 T3

NOMBRE: ADN CIRCULAR de 5620 PB de pICL ACTUALIZADO  
5/01/95

DESCRIPCION: 1 X ITR de Ad5, CMV-luciferasa, vector  
mínimo

SECUENCIA: secuencia basada en la información disponible;  
Construcciones verificadas mediante productos  
digeridos con enzimas de restricción;

Secuencia de las regiones derivadas de ADN  
amplificado verificada mediante análisis de la secuencia

## \*\*\* SECUENCIA \*\*\*

```
1  CATCATCAAT AATATACCTT ATTTTGGATT GAAGCCAATA TGATAATGAG GGGGTGGAGT
61  TTGTGACGTG GGGGGGGGGG TGGGAACGGG GCGGGTGACG TAGTAGTGTG GCGGAAGTGT
121 GATGTTGCAA GTGTGGCGGA ACACATGTAA GCGACGGATG TGGCAAAAGT GACGTTTTTG
181 GTGTGGCGCG GTGTACACAG GAAGTGACAA TTTTGGCGCG GTTTTAGGCG GATGTTGTAG
241 TAAATTTGGG CGTAACCGAG TAAGATTTGG CCATTTTTGG GGGAAAAC TG AATAAGAGGA
301 AGTGAAATGT GAATAATTTT GTGTACTCA TAGCGGTAA TATTTGTCTA GGGCCGCGGG
361 GACTTTGACC GTTTACGTGG AGACTGCCCC AGGTGTTTTT CTCAGGTGTT TCCCGCGTTC
421 CCGGTCAAAG TTGGCGTTTT ATTATTATAG TCAGGGGCTG CAGGTCGTTA CATAACTTAC
481 GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCGCC CCAITGACGT CAATAATGAC
541 GTATGTTGGC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT
601 ACGGTAAACT GCCCACCTGG CAGTACATCA AGGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
661 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGGCGGCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA
721 CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTAGGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
781 TTGGCASTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA CCGGGATTTG CAAGTCTCCA
```



ES 2 231 813 T3

841 CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG  
901 TCGTAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGACGGT GGGAGGTCTA  
961 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC CACGCTGTTT  
1021 TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGG ACTCTAGAGG ATCCGGTACT  
1081 CGAGGAAC TG AAAAACCAGA AAGTTAACTG GTAAGTTTAG TCTTTTTGTC TTTTATTTCA  
1141 GGTCCCGGAT CCGGTGGTGG TGC AAATCAA AGAACTGCTC CTCAGTGGAT GTTGCCTTTA  
1201 CTTCTAGTAT CAAGCTTGAA TTCCTTTGTG TTACATTCTT GAATGTCCCT CGCAGTGACA  
1261 TTAGCATTCC GGTACTGTTG GTAAAAATGGA AGACGCCAAA AACATAAAGA AAGCCCCGGC  
1321 GCCATTCTAT CCTCTAGAGG ATGGAACCGC TGGAGAGCAA CTGCATAAGG CTATGAAGAG  
1381 ATAAGGCTG GTTCTTGAA CAATTTGTTT TACAGATGCA CATATCGAGG TGAACATCAC  
1441 GTACGCGGAA TACTTCGAAA TGTCGGTTCG GTTGGCAGAA GCTATGAAC GATATGGGCT  
1501 GAATACAAAT CACAGAATCG TCGTATGCAG TGA AA ACTCT CTTC AATCTT TTATGCCGGT  
1561 GTTGGGCGCG TTATTTATCG GAGTTGCAGT TCGCCCCGGG AACGACATTT ATAATGAACG  
1621 TGAATTGCTC AACAGTATGA ACATTTCCGA GCCTACCGTA GTGTTTGTTT CCAAAAAGGG  
1681 GTTGCAAAAA ATTTTGAACC TGCAAAAAAA ATTACCAATA ATCCAGAAAA TTATTATCAT  
1741 GGATTTCTAAA ACGGATTACC AGGGATTTCA CTGGATGTAC ACCTTCGTCA ACCTTCATCT  
1801 ACCTCCCGGT TTTAATGAAT ACGATTTTGT ACCAGAGTCC TTTGATCGTG ACAAACAAT  
1861 TGCATGATA ATGAATTCCT CTGGATCTAC TGGGTACCT AAGGGTGTGG CCTTCCGCA  
1921 TAGAACTGCC TGGCTCAGAT TCTCGCATCC CAGAGATCCT ATTTTTGGCA ATCAAATCAT  
1981 TCCGGATACT GCGATTTTAA GTGTTGTTC ATTCATCAC GGTTTTGGAA TGTTTACTAC  
2041 ACTCCGATAT TTGATATGT GATTTCCAGT CGCTTAATG TATAGATTTG AAGAAGAGCT  
2101 GTTTTTACGA TCCCTTCAGG ATTACAAAAT TCAAAGTGGG TTGCTAGTAC CAACCTATT  
2161 TTCATTTCTC GCCAAAAGCA CTCGTATTGA CAAATACGAT TTATCTAATT TACACGAAAT  
2221 TGCTTCGGG GCGCACCTC TTTGAAAAGA AGTCGGGGAA GCGGTTGCAA AACGCTTCCA  
2281 TCTTCCAGGG ATACGACAAG GATATGGGCT CACTGAGACT ACATCAGETA TTCGTATTAC  
2341 ACCCGAGGGG GATGATAAAC CGGGCGCGGT CGGTAAAGTT GTTCCATTTT TTGAAGCGAA  
2401 GGTGTGGGAT CTGGATACCG GGAAAACCGT GGGCGTTAAT CAGAGAGGCG AATTAATGTG  
2461 CAGAGGACCT ATGATTATGT CCGGTTAGT AAACAATCCG GAAGCGACCA ACGCTTGAT  
2521 TGACAAGGAT GGATGGCTAC ATTTCTTGTG CATAGCTTAC TGGGACGAAG ACGAACAAT  
2581 CTTCAATAGTT GACCGCTTGA AGTCTTTAAT TAAATACAAA GGATATCAGG TGGCCCCCGC  
2641 TGAATTGGAA TCGATATTGT TACAACCCC CAACATCTTC GACCGGGGCG TGGCAGGTCT  
2701 TCCCGACGAT GACGCCCCGT AACTTCCCGC CGCCGTTGTT GTTTGGAGC ACGGAAAGAC  
2761 GATGACGGAA AAAGAGATCG TGGATTACGT CGCCAGTCAA GTAACAACCG CGAAAAAGTT  
2821 GCGCGGAGGA GTTGTGTTTC TGGACGAAGT ACCGAAAGGT CTTACCGGAA AACTCGGCG  
2881 AAGAAAAATC AGAGAGATCC TCATAAAGC CAAGAAGGGC GGAAAGTCCA AATTGTAAAA  
2941 TGTAACTGTA TTCAGCGATG ACGAAATCT TAGCTATTGT AATGGGGAT CCCC AACTTG  
3001 TTTATTGCAG CTTATAATGG TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAAA  
3061 GCATTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGGT TTGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTATCAT  
3121 GTCTGGATCG GATCGATCCC CCGGTACCGA GCTCGAATTC GTAATCATGG TCATAGCTGT  
3181 TTCTGTGTG AAATTTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAAGCATAA  
3241 AGTGTAAGC CTGGGCTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGGCTCAC  
3301 TGCCCGCTTT CCAAGTCGGG AACCTTCCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACCGC  
3361 GCGGAGAGG CCGTTTGGCT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC  
3421 GCTCGTCTGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGCGGTA ATACGGTTAT  
3481 CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA  
3541 GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC  
3601 ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC  
3661 AGGCGTTTCC CCTTGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGTTTACCG  
3721 GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACCTGTGA  
3781 GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCCGT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG  
3841 TTCAGCCCCG CCGCTGCGCC TTATCCGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC  
3901 ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG  
3961 GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAAC TACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT  
4021 TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTTTGAT  
4081 CCGGCAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC  
4141 GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGTCTT TGATCTTTTC TACGGGCTCT GACGCTCAGT  
4201 GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTACCT  
4261 AGATCTTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTAA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT  
4321 GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTT  
4381 GTTCATCCAT AGTTGCCCTGA CTCCCTGTCG TG TAGATAAC TACGATACCG GAGGGCTTAC  
4441 CATCTGGCCC CAGTGCCTGCA ATGATACCGC GAGACCCAG CTCACCGGCT CCAGATTTAT  
4501 CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGCGCG AGCGCAGAAG TGGTCTTCCA ACTTTATCCG  
4561 CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTCGCGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA

ES 2 231 813 T3

4621 GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTPIGGTA  
 4681 TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT  
 4741 GCAAAAAAGC GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG  
 4801 TGTTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTTCATG CCATCCGTAA  
 4861 GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCCGC  
 4921 GACCGAGTTG CTCTTGCCCC GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT  
 4981 TAAAAGTGCT CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC  
 5041 TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA  
 5101 CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAAGGAA  
 5161 TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT TATTGAAGCA  
 5221 TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC  
 5281 AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA GAAACCATTA  
 5341 TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAAATAGGC GTATCACGAG GCCTATGCGG TGTGAAATAC  
 5401 CGCACAGATG CGTAAGGAGA AAATACCGCA TCAGGCGCCA TTCGCCATTG AGGCTGCCGA  
 5461 ACTGTTGGGA AGGGCGATCG GTGCGGGCCT CTTGCTATT ACGCCAGCTG GCGAAAGGGG  
 5521 GATGTGCTGC AAGGCGATTA AGTTGGGTAA CGCCAGGGTT TTTCCAGTCA CGACGTTGTA  
 5581 AAACGACGGC CAGTGCCAAG CTTGCATGCC TGCAGGTCGA