Procédé de préparation d'un vecteur viral par recombinaison homologue intermoléculaire

La présente invention concerne une méthode pour préparer un vecteur viral *in vitro* dans une cellule procaryote et son application pour produire une particule virale infectieuse destinée à un usage thérapeutique et, en particulier, un usage en thérapie génique.

La possibilité de traiter les maladies humaines par thérapie génique est passée en quelques années du stade des considérations théoriques à celui des applications cliniques. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient génétiquement immunodéficient en raison d'une mutation affectant le gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de nouveaux protocoles de thérapie génique pour diverses maladies génétiques ou acquises (maladies infectieuses et notamment virales comme le SIDA ou cancers). La grande majorité des protocoles décrits jusqu'à présent met en oeuvre des vecteurs viraux pour transférer et exprimer le gène thérapeutique dans les cellules à traiter.

A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés du fait de la simplicité de leur génome. Cependant, outre leur capacité restreinte de clonage, ils présentent deux inconvénients majeurs qui limitent leur utilisation systématique : d'une part, ils infectent majoritairement les cellules en division et d'autre part, du fait de leur intégration au hasard dans le génome de la cellule hôte, le risque de mutagénèse insertionnelle n'est pas négligeable. C'est pourquoi, de nombreuses équipes scientifiques se sont attachées à développer d'autres types de vecteurs, parmi lesquels on peut citer ceux issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus (AAV), poxvirus et virus de l'herpès. D'une manière générale, leur organisation et leur cycle d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

A cet égard, l'emploi des vecteurs adénoviraux est apparu comme une alternative

prometteuse. Les adénovirus ont été mis en évidence dans de nombreuses espèces animales, ont un large spectre d'hôte, sont peu pathogènes et ne présentent pas les inconvénients liés aux rétrovirus puisqu'ils se repliquent dans les cellules quiescentes et sont non-intégratifs. A titre indicatif, leur génome est constitué d'une molécule d'ADN linéaire et bicaténaire d'environ 36 kb portant plus d'une trentaine de gènes, à la fois des gènes précoces nécessaires à la replication virale (E1 à E4) et des gènes tardifs de structure (L1 à L5) (voir Figure 1).

D'une manière générale, les vecteurs adénoviraux sont obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux (notamment de la région E1 essentielle à la replication virale) qui sont remplacés par les gènes thérapeutiques. En conséquence, ils sont propagés dans une lignée cellulaire, dite de complémentation, qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour générer une particule de vecteur viral défective pour la replication mais capable d'infecter une cellule hôte. On utilise couramment la lignée 293, établie à partir de cellules de rein embryonnaire humain, qui complémente les adénovirus défectifs pour la fonction E1 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., *36*, 59-72).

Les techniques de préparation des vecteurs adénoviraux sont largement décrites dans la littérature (voir notamment Graham et Prevec, Methods in Molecular Biology, Vol 7 ; Gene Transfer and Expression Protocols ; Ed : E.J. Murray, 1991, The Human Press Inc., Clinton, NJ). Une des méthodes les plus employées consiste à générer le vecteur adénoviral recombinant dans les cellules de complémentation transfectées avec un plasmide bactérien portant le gène d'intérêt sous-cloné au sein de sa région d'insertion adénovirale et le génome adénoviral. Généralement, ce dernier est clivé par une enzyme de restriction appropriée afin de réduire l'infectivité de l'ADN viral parental et augmenter l'efficacité d'isolement des adénovirus recombinants. Cependant, on observe néanmoins un bruit de fond important de particules virales infectieuses d'origine parentale, ce qui nécessite un travail d'analyse des plages obtenues particulièrement lourd (d'un point de vue temps et coût puisque chaque plage doit être amplifiée et analysée individuellement). Ceci est problématique lorsque le virus

parental présente un avantage sélectif sur l'adénovirus recombinant, par exemple lorsque ce dernier se replique plus lentement que le virus parental, du fait de l'insertion d'un gène d'intérêt de grande taille (Facteur VIII, dystrophine), réduisant d'autant sa probabilité d'obtention.

La ligation entre deux fragments d'ADN générés par les techniques classiques de biologie moléculaire et portant respectivement les parties 5' et 3' du vecteur adénoviral recombinant peut également être employée. La transfection du mélange de ligation dans les cellules de complémentation permet en théorie d'encapsider le génome de l'adénovirus recombinant pour former une particule infectieuse. Cette technologie est peu efficace et son application limitée par le nombre restreint de sites de restriction appropriés et uniques.

On a maintenant montré qu'il est possible de générer dans *Escherichia coli* (*E. coli*) un vecteur adénoviral recombinant par recombinaison homologue intermoléculaire entre un plasmide contenant le génome d'un adénovirus de type 5 et un insert portant une séquence d'ADN exogène entourée de séquences adénovirales A et B (Figure 2). Ce procédé conduit au remplacement dans le génome adénoviral de la région ciblée située entre A et B par la séquence exogène. La transfection du vecteur adénoviral recombinant ainsi généré dans une lignée de complémentation adéquate donne lieu à une particule virale infectieuse qui peut être utilisée sans étape préalable de purification pour infecter une cellule hôte. Le bruit de fond (contamination par des particules virales parentales) est réduit voire même supprimé. En outre, on a trouvé de manière surprenante que l'usage de souches d'E. coli recBC sbcBC est particulièrement avantageux pour favoriser la recombinaison intermoléculaire entre deux fragments quelconques d'ADN.

Le procédé de la présente invention repose sur l'exploitation des activités enzymatiques endogènes des cellules procaryotes impliquées dans la recombinaison homologue. cette technique de recombinaison intermoléculaire avait déjà été décrite pour le clonage de petits inserts dans les vecteurs bactériens (Bubeck et al., 1993,

Nucleic Acids Research, *21*, 3601-3602) ou pour générer par recombinaison intramoléculaire des gènes hybrides (Calogero et al., 1992, FEMS Microbiology Letters, *97*, 41-44 ; Caramori et al., 1991, Gene, *98*, 37-44). Cependant, cette technologie de recombinaison n'avait jamais été mise en oeuvre dans des cellules procaryotes pour générer des vecteurs viraux infectieux (capables d'être encapsidés en particules virales infectieuses).

Le procédé de l'invention présente l'avantage sur les techniques antérieures d'être rapide, particulièrement efficace et de ne requérir que peu de manipulations *in vitro*. De plus, il peut être mis en oeuvre avec des fragments d'ADN générés par PCR (Polymerase Chain Reaction) évitant ainsi les étapes de sous-clonage de la séquence d'ADN exogène dans la région d'insertion du génome viral. Enfin, il apporte une solution avantageuse au problème de bruit de fond clairement identifié dans la littérature. Par conséquent, il s'avère particulièrement performant pour les vecteurs issus de virus de grande taille ou dans lesquels on envisage d'insérer une séquence d'ADN exogène de grande taille.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant dérivé d'un virus parental dans le génome duquel est insérée une séquence d'ADN exogène, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome du virus parental et (ii) un second fragment d'ADN comprenant ladite séquence d'ADN exogène entourée de séquences flanquantes A et B homologues à (i).

Au sens de la présente invention, un vecteur viral recombinant est obtenu à partir d'un virus parental modifié de manière à porter en un site approprié du génome viral et exprimer une séquence d'ADN exogène. Les virus parentaux susceptibles d'être utilisés dans le cadre de l'invention sont, par exemple, les alphavirus, les rétrovirus, les poxvirus et notamment le virus de la vaccine ou le canarypox, les virus de l'herpès, les virus associés aux adénovirus (AAV) et tout particulièrement les adénovirus.

A cet égard, le choix de l'adénovirus parental est très large. Il peut s'agir d'un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore d'un adénovirus hybride comprenant des fragments de génome adénoviral de différentes origines. On préfèrera tout particulièrement un adénovirus d'origine humaine de sérotype C et de préférence un adénovirus de type 2 ou 5 ou encore un adénovirus d'origine animale de type CAV-1 ou CAV-2 (canine), DAV (aviaire) ou encore BAd (bovine). Ces virus et leur génome sont décrits dans la littérature (voir par exemple Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., *128*, 171-176 ; Spibey et Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., *70*, 165-172 ; Jouvenne et al., 1987, Gene, *60*, 21-28 ; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., *76*, 93-102).

Un procédé selon l'invention a pour objet la préparation d'un vecteur viral recombinant pour le transfert et l'expression d'une séquence d'ADN exogène dans une cellule hôte. Par "séquence d'ADN exogène", on entend un acide nucléique qui comprend des séquences codantes et des séquences régulatrices permettant l'expression desdites séquences codantes et dans lequel les séquences codantes sont des séquences qui ne sont normalement pas présentes dans le génome d'un virus parental en usage dans la présente invention ou si elles le sont dans un contexte génomique différent. Dans le cadre de l'invention, la séquence d'ADN exogène peut-être constituée d'un ou plusieurs gènes. Les séquences régulatrices peuvent être d'origines quelconques.

D'une manière préférée, la séquence d'ADN exogène peut coder pour un ARN anti-sens et/ou un ARNm qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt. Elle peut être de type génomique, de type ADN complémentaire (ADNc) ou de type mixte (minigène, dans lequel au moins un intron est délété). Elle peut coder pour une protéine mature, un précurseur d'une protéine mature, notamment un précurseur destiné à être secrété et comprenant de ce fait un peptide signal, une protéine chimérique provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou un mutant d'une protéine naturelle présentant des propriétés biologiques améliorées ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) du gène codant pour la protéine naturelle.

Dans le cadre de la présente invention, il peut être avantageux d'utiliser :

- les gènes codant pour des cytokines ou des lymphokines, comme les interférons α, β et γ, les interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6 ou l'IL-10, les facteurs nécrosant des tumeurs (TNF) et les facteurs stimulateurs de colonies (CSF) ;

- les gènes codant pour des récepteurs cellulaires, comme les récepteurs reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites), de préférence par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain), ou les ligands de récepteurs cellulaires ;

- les gènes codant pour les hormones de croissance (HGF) ;

- les gènes codant pour des facteurs de coagulation, comme le facteur VIII et le facteur IX ;

- le gène codant pour la dystrophine ou la minidystrophine ;

- le gène codant pour l'insuline ;

- les gènes codant pour des polypeptides intervenant directement ou indirectement dans les canaux ioniques cellulaires, comme la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ;

- les gènes codant pour des ARN anti-sens ou des protéines capables d'inhiber l'activité d'une protéine produite par un gène pathogène, présent dans le génome d'un organisme pathogène, ou par un gène cellulaire, dont l'expression est dérégulée, par exemple un oncogène ;

- les gènes codant pour un inhibiteur de protéase comme l'α 1-antitrypsine ou

un inhibiteur d'une protéase virale ;

- les gènes codant pour des variants de protéines pathogènes qui ont été mutées de façon à altérer leur fonction biologique, comme par exemple des variants trans-dominants de la protéine TAT du virus VIH capables de compétition avec la protéine naturelle pour la liaison à la séquence cible, empêchant ainsi la réplication du VIH ;

- les gènes codant pour des épitopes antigéniques afin d'accroître l'immunité de la cellule hôte ;

- les gènes codant pour des polypeptides ayant des propriétés anticancéreuses et notamment des suppresseurs de tumeurs comme la protéine p53 ;

- les gènes codant pour les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II, ainsi que les gènes codant pour les protéines régulatrices de l'expression de ces gènes ;

- les gènes codant pour des enzymes cellulaires ou produites par des organismes pathogènes ; et

- les gènes suicides. On peut citer plus particulièrement le gène TK-HSV-1. L'enzyme TK virale présente une affinité nettement supérieure par rapport à l'enzyme TK cellulaire pour certains analogues de nucléosides (comme l'acyclovir ou le gancyclovir). Elle les convertit en molécules monophosphatées, elles-mêmes convertibles par les enzymes cellulaires, en précurseurs de nucléotides, qui sont toxiques. Ces analogues de nucléotides sont incorporables dans les molécules d'ADN en voie de synthèse, donc principalement dans l'ADN des cellules en état de réplication. Cette incorporation permet de détruire spécifiquement les cellules en division comme les cellules cancéreuses.

- les gènes codant pour un anticorps, un fragment d'anticorps ou une immunotoxine.

- les gènes rapporteurs comme le gène Lac-Z, codant pour la β-galactosidase ou le gène luciférase.

Cette liste n'est pas limitative et bien entendu d'autres gènes peuvent être également employés.

Par ailleurs, une séquence d'ADN exogène en usage dans la présente invention peut en outre comprendre un gène non-thérapeutique, par exemple un gène codant pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées. On peut citer le gène *néo* (codant pour la néomycine phosphotransférase) conférant une résistance à l'antibiotique G418, le gène *dhfr* (Dihydrofolate Réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl transférase), le gène pac (Puromycine Acétyl-Transferase) ou encore le gène *gpt* (Xanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase).

Bien entendu, un gène en usage dans la présente invention peut être placé sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. Par "éléments appropriés", on entend l'ensemble des éléments nécessaires à sa transcription en ARN (ARN anti-sens ou ARNm) et à la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi les éléments nécessaires à la transcription, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur régulable et il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou même virale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène en question. D'une façon générale, un promoteur en usage dans la présente invention, peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices. A titre d'exemples de promoteurs tissus-spécifiques, on peut citer ceux des gènes d'immunoglobulines lorsque l'on cherche à cibler l'expression dans des cellules hôtes lymphocytaires et du gène α 1-antitrypsine pour une expression foie-spécifique. On peut également mentionner les promoteurs

constitutifs du gène TK-HSV-1 (thymidine kinase du virus de l'herpès de type 1), du gène PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), un LTR rétroviral, ou encore le promoteur adénoviral MLP, notamment de l'adénovirus humain de type 2.

Le procédé selon l'invention met en oeuvre un mécanisme de recombinaison homologue intermoléculaire. D'une manière générale, il consiste en l'échange de séquences homologues entre deux fragments d'ADN. Ces séquences peuvent être identiques ou substantiellement homologues. En d'autres termes le degré d'homologie des séquences A et B avec la partie correspondante du premier fragment d'ADN peut être variable mais doit être suffisant pour permettre la recombinaison intermoléculaire. Aux fins de la présente invention, il est préférable qu'il soit supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et de manière tout à fait préférée aux environs de 100%. De plus, une courte région d'homologie peut être suffisante (au moins 10 nucléotides consécutifs communs entre les séquences A et B et leurs séquences homologues dans le premier fragment d'ADN). Dans le cadre de la présente invention, la longueur des séquences A et B est de préférence comprise entre 10 pb et 10 kb, avantageusement 20 pb et 5 kb, de préférence 30 pb et 2 kb et, de manière tout à fait préférée, 40 pb et 1 kb.

Selon un mode avantageux, un procédé selon l'invention conduit au remplacement du matériel génétique localisé entre les séquences du premier fragment d'ADN homologues aux séquences A et B par la séquence exogène. Cet échange intermoléculaire permet de générer un vecteur viral recombinant circulaire sous forme d'un vecteur procaryotique (plasmide, cosmide ou phage) permettant sa manipulation et/ou sa propagation dans la cellule procaryote. Un mode de réalisation du mécanisme mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention est illustré dans la Figure 2.

Bien que la région d'insertion de la séquence exogène puisse être située à n'importe quelle position du génome viral, on préfère éviter les régions agissant *en cis* nécessaires à la replication. Ces dernières comprennent notamment les LTRs 5' et 3'

ainsi que le signal d'encapsidation dans le cas des rétrovirus et les ITRs 5' et 3' et la région d'encapsidation s'agissant des adénovirus. On indique que la région d'insertion peut être dirigée en des positions variées en fonction des séquences homologues A et B choisies.

Comme indiqué précédemment, le premier fragment d'ADN comprend tout ou partie du génome du virus parental en usage dans le cadre de l'invention. Il peut s'agir du génome d'un virus sauvage ou du génome d'un virus en dérivant modifié par délétion, addition et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides. En particulier, il peut être délété d'un ou plusieurs gènes en totalité ou en partie.

Le premier fragment d'ADN est de préférence inclu dans un vecteur conventionnel. Le choix de celui-ci est très large, mais on peut citer plus particulièrement le pBR322, le p polyII ou encore le p poly III*I (Lathe et al., 1987, Gene, *57*, 193-201). Selon un mode de réalisation avantageux du procédé selon l'invention, le premier fragment d'ADN est de préférence linéarisé au niveau de la région dans laquelle on envisage de cibler l'insertion. En particulier, il peut être clivé par une ou plusieurs enzymes de restriction dont les sites sont localisés entre les séquences du premier fragment d'ADN homologues aux séquences A et B, mais également au niveau de ces dernières bien que ce mode de réalisation ne soit pas préféré. Le choix des sites de restriction à utiliser selon le virus parental retenu est à la portée de l'homme du métier. Avantageusement, on préférera utiliser des sites peu représentés dans le premier fragment d'ADN et en particulier uniques. Par ailleurs, de tels sites peuvent également être crées par les techniques classiques de mutagénèse dirigée.

Le second fragment d'ADN en usage dans la présente invention porte notamment la séquence d'ADN exogène entourée des séquences A et B impliquées dans la recombinaison intermoléculaire. On préfère employer un fragment d'ADN linéaire. Il peut être généré par PCR, excisé d'un vecteur quelconque ou produit par voie synthétique ou toute méthode conventionnelle dans le domaine de l'art. A titre d'exemple, un second fragment d'ADN en usage dans le cadre de la présente invention

peut être obtenu par amplification de la séquence d'ADN exogène à partir d'un vecteur de l'art antérieur ou d'une banque génomique ou d'un ADNc adéquat à l'aide d'amorces appropriées munies à leurs extrémités 5' des séquences A et B. En outre, un second fragment d'ADN peut également comprendre des séquences plasmidiques à ses extrémités 5' et 3', qui peuvent éventuellement être utilisées à titre de séquences A et B dans la mesure où elles sont homologues aux séquences plasmidiques contenues dans le premier fragment d'ADN.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un procédé selon l'invention est mis en oeuvre pour la préparation d'un vecteur viral recombinant défectif pour la replication. Ce terme désigne un vecteur incapable d'achever un cycle infectieux autonome dans une cellule hôte. Généralement, le génome de ces vecteurs défectifs est dépourvu d'un ou plusieurs gènes essentiels à la replication, gènes précoces et/ou gènes tardifs. Ils peuvent être délétés en totalité ou en partie ou rendus non fonctionnels par mutation (addition, délétion et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides). A cet égard, un procédé selon l'invention peut permettre la préparation d'un vecteur adénoviral recombinant dépourvu de tout ou partie des régions E1, E2, E3 et/ou E4.

A titre illustratif, on peut citer les modes de réalisation suivants. Lorsqu'il s'agit de préparer dans une cellule procaryote un vecteur adénoviral recombinant dérivant d'un adénovirus humain de type 5 (Ad5) dans lequel on envisage d'insérer une séquence d'ADN exogène à la place de la région E1, on peut mettre en oeuvre (i) un vecteur comportant le génome de l'Ad5 clivé par l'enzyme *Cla*I (site de restriction situé en position 918 du génome Ad5 tel que divulgué dans la banque de données Genebank sous la référence M73260) et (ii) un fragment d'ADN comprenant une séquence A homologue à la région d'encapsidation adénovirale, la séquence d'ADN exogène suivie d'une séquence B homologue à la séquence codant pour la protéine pIX. Par ailleurs, l'usage d'un vecteur portant le génome adénoviral clivé par l'enzyme *Spe*I (position 27082 du génome Ad5) et d'un fragment d'ADN comprenant une séquence A homologue à l'extrémité 5' de la région E2, la séquence d'ADN exogène et une

séquence B homologue à l'extrémité 3' de la région E4 permettra de préparer un vecteur adénoviral recombinant dans lequel la séquence d'ADN exogène est insérée à la place de la région E3. Bien entendu, ces modes de réalisation particuliers ne sont cités qu'à titre d'exemples. Enfin, le procédé selon l'invention peut être utilisé pour introduire des délétions, mutations et/ou substitutions dans une région particulière d'un génome viral.

La présente invention s'avère particulièrement avantageuse lorsqu'il s'agit de préparer un vecteur viral recombinant d'au moins 20 kb et, de manière tout à fait préférée, d'au moins 30 kb et plus particulièrement d'un vecteur ayant un génome d'une longueur de 80 à 120% de celle du génome du virus sauvage correspondant, notamment de 90 à 110% et, de préférence, de 95 à 105%.

Selon un autre mode de réalisation, un procédé selon l'invention peut également être employé pour insérer au moins deux fragments d'ADN au sein du génome viral, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome du virus parental, (ii) un second fragment d'ADN comprenant une première partie de ladite séquence d'ADN exogène munie à son extrémité 5' de ladite séquences flanquantes A et (iii) un troisième fragment d'ADN comprenant une deuxième partie de ladite séquence d'ADN exogène munie à son extrémité 3' de ladite séquences flanquantes B ; lesdits seconds et troisièmes fragments d'ADN comportant une séquence homologue se recouvrant à leurs extrémités 3' et 5' respectives. A titre indicatif, ces séquences homologues entre les seconds et troisièmes fragments d'ADN répondent aux mêmes critères d'homologie et de longueur que les séquences A et B. Ce mode de réalisation spécifique est particulièrement avantageux pour le clonage des séquences exogènes de grande taille.

Un procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre dans toute cellule procaryote et notamment dans une bactérie dérivée d'une souche d'*Escherichia coli*. Mais, on préfère tout particulièrement employer une souche recBC sbcBC comme par exemple les souches CES200, CES201, W5449 et BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol., *166*,

557-580).

Une procédure typique d'un procédé selon l'invention comprend les étapes suivantes :

(a) on co-introduit ou on introduit de manière séparée dans une cellule procaryote un premier fragment d'ADN et (ii) un second fragment d'ADN tels que définis précédemment,

(b) on cultive la cellule procaryote obtenue à l'étape (a) dans des conditions appropriées pour permettre la génération du vecteur viral recombinant par recombinaison intermoléculaire, et

(c) on récupère le vecteur viral recombinant.

Dans le cadre d'un procédé selon l'invention, les quantités de premiers et seconds fragments d'ADN peuvent varier. On préfère employer une concentration 10 fois plus importante de second fragment par rapport au premier. L'introduction des fragments d'ADN dans une cellule procaryote et la récupération du vecteur de ces mêmes cellules sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

La présente invention concerne également un procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un vecteur viral recombinant obtenu en mettant en oeuvre un procédé selon l'invention, selon lequel :

(a) on introduit ledit vecteur viral recombinant dans une cellule mammifère pour générer une cellule de mammifère transfectée,

(b) on cultive ladite cellule de mammifère transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(c) on récupère ladite particule virale de la culture cellulaire obtenue à l'étape (b).

Les cellules peuvent être transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer notamment la technique au phosphate de calcium, la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection ou les méthodes basées sur l'emploi de liposomes. Selon un mode de réalisation préféré, la cellule mammifère est avantageusement une cellule de complémentation et notamment la cellule 293 dans le cadre d'un vecteur dérivant d'un adénovirus. Les particules virales peuvent être récupérées du surnageant de culture, mais également des cellules selon les protocoles conventionnels.

La présente invention couvre également l'usage d'une particule virale infectieuse ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon un procédé selon l'invention, pour le traitement thérapeutique ou chirurgical du corps humain et notamment par thérapie génique. Un procédé selon l'invention est plus particulièrement destiné au traitement préventif ou curatif de maladies telles que les maladies génétiques (hémophilie ; thalassémies, emphysème, maladie de Gaucher, mucoviscidose, myopathie de Duchêne ou de Becker...) les cancers, les maladies virales (SIDA., infections herpétiques ou dues au cytomégalovirus ou au papillomavirus). Aux fins de la présente invention, les vecteurs et particules virales préparés par un procédé selon l'invention peuvent être introduits soit *in vitro* dans une cellule hôte prélevée du patient, soit directement *in vivo* dans l'organisme à traiter. De préférence, la cellule hôte est une cellule humaine et, de manière préférée une cellule pulmonaire, fibroblastique, musculaire, hépatique, lymphocytaire ou une cellule de la lignée hématopoïétique.

La présente invention vise également une composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'une particule virale infectieuse ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon un procédé selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Une telle composition pharmaceutique peut être préparée selon les techniques communément en usage et

administrée par toute voie d'administration connue, par exemple par voie systémique (notamment intraveineuse, intratrachéale, intrapéritonéale, intramusculaire, sous-cutanée intratumorale ou intracranienne) ou par aérosolisation ou instillation intrapulmonaire.

Enfin, la présente invention a également pour objet l'usage d'une particule virale infectieuse ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon un procédé selon l'invention, pour l'expression d'une séquence d'ADN d'intérêt dans un système cellulaire.

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux figures suivantes et à l'aide des exemples suivants.

La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100), indiquant l'emplacement des différents gènes.

La Figure 2 illustre un procédé de recombinaison intermoléculaire entre deux fragments d'ADN. les séquences plasmidiques sont représentées par un trait fin, les séquences virales par un trait gras et la séquence exogène par une boîte hachurée.

La Figure 3 est une représentation schématique du vecteur pTG3614 correspondant au p polyII dans lequel est cloné le génome d'un adénovirus recombinant modifié dans la région E1 par insertion d'une cassette d'expression du gène FIX humain.

La Figure 4 est une représentation schématique du vecteur pTG4652 correspondant au p polyII dans lequel est cloné le génome d'un adénovirus recombinant modifié dans les régions E1, E3 et E4 par insertion d'une cassette d'expression du gène CF humain et délétions partielles.

EXEMPLES

Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

Les constructions décrites ci-après sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de biologie moléculaire détaillées dans Maniatis et al (1989, *supra*). Les sites de restriction protubérants en 5' peuvent être convertis en sites francs par traitement par le grand fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E.coli* alors que les sites protubérants en 3' sont traités par la T4 polymérase. En ce qui concerne les étapes d'amplification par PCR, on applique le protocole tel que décrit dans PCR Protocols-A guide to methods and applications (1990, ed Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press Inc.). Les cellules sont transfectées par les méthodes conventionnelles et sont cultivées selon les recommandations du fournisseur. Les fragments insérés dans les différentes constructions décrites ci-après sont indiqués précisément selon leur position dans le génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sour la référence M73260.

EXEMPLE 1 : Construction d'un vecteur viral recombinant dérivé d'un adénovirus humain de type 5 sous forme d'un plasmide bactérien

A. Clonage du génome d'Adénovirus 5 (Ad5) dans p polyII

On synthétise l'extrémité gauche du génome d'Ad5 (nucléotides 1 à 935) par PCR à l'aide des amorces oligonucléotidiques oTG6597(SEQ ID NO: 1) et oTG6598 (SEQ ID NO: 2). La première s'hybride aux 21 premiers nucléotides de l'ITR 5' et présente un site *Pac*I, immédiatement en amont des séquences virales, et un site *Eco*RI utilisé pour le clonage. La deuxième amorce permet l'introduction des sites *Sal*I puis *Bgl*II en aval des séquences virales. La matrice engagée dans cette réaction est l'ADN génomique d'Ad5 préparé selon les méthodes conventionnelles. On digère le fragment ainsi amplifié par *Eco*RI et *Bgl*II et on le clone dans le plasmide p polyII (Lathe et al., 1987, *supra*) préalablement clivé par ces deux mêmes enzymes de restriction pour

obtenir le pTG1692.

On prépare le fragment d'ADN correspondant à l'extrémité droite du génome d'Ad5 (nucléotides 35103 à 35935) suivant le même principe en utilisant le couple d'oligonucléotides oTG6599 (SEQ ID NO: 3) et oTG6597 (SEQ ID NO: 1). On construit le pTG1693 en insérant le fragment amplifié digéré par *Eco*RI et *Bgl*II dans les mêmes sites de p polyII. On excise de pTG1693 un fragment *Bgl*II-*Bam*HI portant les séquences amplifiées de façon à l'introduire dans le site *Bgl*II de pTG1692 en aval des séquences 5' adénovirales. Le pTG3601 ainsi obtenu est linéarisé entre les extrémités gauche et droite du génome d'Ad5 par digestion avec les enzymes de restriction *Bgl*II ou *Sal*I. Les extrémités ainsi générées sont rendues franches par l'action du fragment klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*. Des bactéries BJ5183 (Hanahan, 1983 *supra*) rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium sont co-transformées avec la préparation précédente et l'ADN génomique d'Ad5. Les colonies obtenues sont analysées par cartographie de restriction. On sélectionne un clone désigné pTG3602 généré par recombinaison homologue intermoléculaire dans lequel les séquences adénovirales (nucléotides 936 à 35102) ont été insérées entre les deux fragments produits par PCR, de manière à générer un vecteur plasmidique comprenant le génome complet de l'Ad5 - pTG3602 est produit dans les bactéries C600 (Huynh et al., 1985 DNA cloning, Volume1, ed. Glover, IRL Press Limited : Oxford, England p56-110).

B. Evaluation du pouvoir infectieux de pTG3602

On libère le génome viral par l'action de l'enzyme de restriction *Pac*I. Des cellules 293 cultivées en monocouche sont transfectées avec le produit de cette digestion par la technique de précipitation au phosphate de calcium. On peut également utiliser d'autres cellules sensibles, par exemple les cellules A549 (ATCC CCL185). On fait croître les cellules sous agar pendant 9 à 14 jours, période durant laquelle l'apparition de plages de lyse sur le tapis cellulaire témoigne de la production de particules virales infectieuses et donc, de la capacité du génome d'Ad5 issu de pTG3602 à se répliquer.

C. *Construction d'un vecteur adénoviral recombinant défectif dans lequel le gène exogène remplace la région précoce E1.*

On utilise un plasmide dans lequel le gène rapporteur Lac Z codant pour la β-galactosidase est placé dans un contexte viral ; par exemple un plasmide dérivé du pMLP-Adk7 (Stratford-Perricaudet et Perricaudet, 1991, Human Gene Transfer, 219, 51-61) comprenant les séquences 5' de l'Ad 5 (nucléotides 1 à 458), le promoteur MLP Ad2, le gène Lac Z, le signal de polyadénylation du virus SV40 et les séquences Ad5 comprises entre les nucléotides 3329 à 6241.

La cassette d'expression du gène Lac Z ceinte de séquences adénovirales est excisée par l'action des enzymes de restriction *Bsr*GI (position 192 sur le génome d'Ad5) et *Pst*I (position 3788) puis purifiée. Le pTG3602 est linéarisé au niveau du site *Cla*I (position 918) puis traité avec la klenow. Les deux fragments obtenus sont co-transformés dans des bactéries BJ5183 compétentes. Une recombinaison au niveau des séquences adénovirales homologues entraîne le remplacement de la région E1 d'Ad5 (nucléotides 459 à 3328) par la cassette d'expression du gène rapporteur dans le plasmide pTG3603.

Son pouvoir infectieux est vérifié par transfection d'un tapis de cellules 293 transfectées avec pTG3603 préalablement digéré par *Pac*I. Les plages de lyse formées sont alors piquées et les particules virales remises en suspension et utilisées pour infecter une monocouche de cellules 293. La coloration des cellules en bleu après addition de X-Gal témoigne de l'expression du gène Lac Z.

D. *Construction d'un vecteur adénoviral recombinant dans lequel le gène exogène remplace la région précoce E3*

Une cassette d'expression du gène codant pour la protéine gp19 de la région E3 d'Ad5 (nucléotides 28731 à 29217) est assemblée dans le bactériophage M13mp18 (Gibco BRL) par clonage de deux fragments PCR l'un correspondant au LTR 3' de RSV

(Rous Sarcoma Virus) (amorces oligonucléotidiques oTG5892-SEQ ID NO: 4 et 5893-SEQ ID NO: 5) et l'autre à la séquence codant pour la gp19 (oTG5455-SEQ ID NO: 6 et 5456-SEQ ID NO: 7). On obtient le vecteur M13TG1683, dont on excise la cassette d'expression par une digestion *Xba*I. Après traitement avec la klenow, il est introduit dans le site *Bsm*I (rendu franc par action de l'ADN polymérase du phage T4) de pTG8519. Celui-ci dérive du plasmide puc19 (Gibco BRL), dans lequel on a inséré les séquences adénovirales comprises entre le site *Spe*I et l'extrémité droite du génome (nucléotides 27082 à 35935) mais dépourvues de la majorité de la région E3 (nucléotides 27871 à 30758). On obtient le pTG1695 dont on remplace le fragment *Sca*I-*Spe*I, porteur des séquences plasmidiques, par un fragment équivalent purifié de pTG1659. Celui-ci correspond au puc19 comprenant les séquences de l'Ad5 s'étendant des nucléotides 21562 à 35826. Le pTG1697 ainsi obtenu présente des séquences adénovirales qui s'étendent du site *Bam*HI (position 21562) à l'ITR 3' (position 35935) dans lesquelles la région E3 est remplacée par une cassette d'expression de la gp19 sous contrôle du promoteur constitutif RSV. Le fragment *Dra*I (position 22444 et 35142 sur le génome d'Ad5) est purifié, et co-introduit dans les bactéries BJ-5183 compétentes avec pTG3602 linéarisé par *Spe*I et traité par la klenow. Les recombinants porteurs d'un plasmide généré par recombinaison sont criblés pour la présence du promoteur RSV. Le pTG3605, vecteur plasmidique porteur du génome d'Ad-gp19+, est ainsi mis en évidence.

Le pouvoir infectieux génome viral excisé du plasmide pTG3605 est testé suivant le protocole déja décrit précédemment. La production d'une protéine gp19 fonctionnelle est suivie par co-immunoprécipitation des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de celle-ci (Burgert et Kvist, 1985, Cell, *41*, 987-997).

E. Contruction d'un vecteur adénoviral recombinant défectif dans lequel les deux régions précoces E1 et E3 sont remplacées par des gènes exogènes

Les cellules BJ-5183 sont co-transformées par le fragment *Dra*I isolé de pTG1697

mentionné ci-dessus et le fragment *Spe*I (Klenow) isolé de pTG3603. Le plasmide résultant est testé dans les mêmes conditions que précédemment.

F. Construction d'un vecteur adenoviral recombinant exprimant le gène FIX

Le cDNA codant pour le FIX humain a été cloné sous forme d'un fragment *Bam*HI dans le plasmide pTG381. Dans ce dernier, l'extrémité 5' non codante du gène FIX a été modifiée de manière à être conforme aux règles de Kozak. Le plasmide pTG381 est décrit dans la publication du brevet FR 2 600 334. Le gène FIX est recloné dans le site *Bam*HI de pTG6512, pour donner pTG4375. pTG6512 dérive du vecteur pTG6511 après délétion du promoteur tardif majeur (MLP) de l'Ad2 et remplacement par un polylinker. A titre indicatif, la construction du pTG6511 est détaillée à l'exemple 1 de la demande internationale WO 94/28152. Le promoteur PGK murin est isolé par les méthodes conventionnelles à partir d'ADN génomique de souris selon Adra et al. (1987, Gene *60*, 65-74) ou à l'aide d'amorces adéquates créées à partir des données de séquence divulguées dans la banque de données Genebank sous la référence X15339. Des sites de restriction *Pst*I sont inclus aux extrémités 5' des amorces afin de faciliter les étapes de clonage ultérieures. Le fragment portant le promoteur PGK est traité par la T4 polymérase puis introduit en amont du gène humain FIX dans le site *Hpa*I de pTG4375 dont on excise par digestion *Msc*I un fragment dit "de remplacement" comportant la cassette FIX entourée de séquences adénovirales E1 (185pb en 5' et 2045pb en 3').

Celui-ci est cotransformé dans le bactéries BJ5183 en présence du vecteur pTG3602 digéré par *Cla*I (position 918). Les transformants sont sélectionnés sur ampicilline et analysés par cartographie de restriction. On retient le clone désigné pTG3614 correspondant à un vecteur adénoviral comportant le gène thérapeutique FIX à la place de la région E1 (Figure 3). Un stock viral est constitué de manière conventionnelle, par transfection du génome adénoviral libéré par digestion *Pac*I dans la lignée 293. Après une étape d'amplification, les cellules sont lysées et les particules virales AdTG3614 purifiées par centrifugation sur chlorure de césium.

La capacité à transférer et exprimer le gène FIX est évaluée en modèle animal souris. Pour ce faire, 1,5 x 10^9 ufp sont injectées dans la veine caudale de souris femelles C57 Black 6 agées de 5 à 6 semaines. Des échantillons de sang sont prélevés régulièrement sur lesquels on dose la quantité de FIX humain par ELISA (Kit Diagnostica Stago, Asnières, France ; Asserachirom ^{R} IX : Ag 00564). Le FIX est detecté dans le serum de souris pendant plusieurs semaines avec un maximum à 5 jours.

G. Construction d'un vecteur adénoviral modifié dans la région E2

Lors du cycle viral normal, l'expression des gènes de la région E2 est induite par les produits précoces de E1 et E4 et on observe une production abondante des protéines codées par E2 et, en particulier, de la protéine DBP (pour DNA Binding Protein). Or, cette expression élevée peut être problématique *in vivo* (induction de réponses inflammatoires ou interférence avec l'expression du transgène). C'est pourquoi, des vecteurs adénoviraux défectifs pour la fonction E2A ont été construits soit par introduction d'une mutation thermosensible dans E2A (position 22795 ; C en T résultant en un changement Pro en Ser) ou par d'une délétion partielle du gène DBP.

Le vecteur pTG9551 portant la mutation thermosensible est généré par recombinaison homologue dans les cellules BJ entre pTG3601 digéré par *Bgl*II et l'ADN génomique purifié du virus Ad5Hts 125 (Ensinger et Ginsberg, 1972, J. Virol. *10*, 328-339). Le génome ainsi reconstitué est libéré par digestion *Pac*I et tranfecté dans les cellules 293 qui sont incubées à 32°C pour la production des particules virales (la température non permissive est 39°C).

La défectuosité de E2A peut également être générée par délétion partielle des régions codantes du gène DBP en évitant les régions recouvrant d'autres cadres de lecture. La construction est réalisée par recombinaison homologue entre pTG3601 *Bgl*II et l'ADN viral préparé à partir du virus H5dl802 (Rice et Klessig, 1985, J. Virol. *56*, 767-778). Les virus peuvent être produits dans une lignée de complémentation appropriée trans-complémentant la fonction DBP, par exemple la lignée 293 transfectée par un vecteur

permettant l'expression constitutive ou régulée du gène DBP.

H. Construction d'un vecteur adénoviral modifié dans la région E4

Dans un premier temps, on construit un vecteur dit "de remplacement" comprenant une cassette d'expression du gène codant pour la protéine CFTR placée au sein de la région adénovirale E1. Ce vecteur désigné pTG8585 contient les éléments suivants, tous décrits dans la littérature :

- l'ITR 5' Ad5 (positions 1 à 458),
- le promoteur MLP Ad2,
- le cDNA CFTR humain,
- le signal de polyadenylation du gène de la β-globine de lapin,
- le LTR 3' du virus RSV (Rous Sarcoma virus),
- les séquences adénovirales codant pour la protéine gp19 (positions 28731 à 29217 de l'Ad5), et
- la partie 3' de la région E1B (position 3329 à 6241).

En parallèle, les séquences adénovirales recouvrant les régions E3 et E4 sont sous-clonées dans le vecteur p poly II et déletées par les techniques classiques de biologie moléculaire. On élimine les séquences E3 (positions 28592 à 30470) par digestion *Xba*I et les séquences E4 (positions 32994 à 34998). Le génome adénoviral ainsi modifié est reconstitué par recombinaison homologue entre un fragment de remplacement portant ces modifications isolé du vecteur précédent et pTG3603 digéré par *Spe*I. On obtient pTG8595 portant un génome adénoviral recombinant (gène Lac Z à la place de la région E1) et défectif pour les fonctions E3 et E4.

Les cassettes d'expression des gènes CFTR et gp19 indiquées ci-dessus sont introduites dans pTG8595 en remplacement du gène Lac Z par co-transformation des cellules BJ5183 par le fragment *Pac*I - *Bst*EII isolé de pTG8585 et le vecteur pTG8595 linéarisé par *Cla*I. On génère pTG4652 (Figure 4) qui peut être propagé dans une lignée cellulaire complémentant les fonctions E1 et E4 défectives telles que

décrites dans la demande internationale WO94/28152.

Les particules virales sont amplifiées, les cellules lysées et les extraits cellulaires totaux sont analysés pour l'expression du gène CFTR par Western blot (gel SDS-PAGE 8 %). Les filtres sont incubés en présence d'une dilution au 1/5000 de l'anticorps monoclonal MAB 1104 dirigé contre un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 722 à 734 de la protéine CFTR humaine. La detection est réalisée par la méthode ECL (Enhanced ChemiLuminescence ; kit Amersham). On observe dans les extraits de cellules infectées par AdTG4652 une bande de forte intensité et assez diffuse correspondant à un produit de poids moléculaire élevé comigrant avec un témoin CFTR. Cette bande n'est pas présente dans les extraits issus du virus parental pTG8595 qui ne contient pas la cassette d'expression CFTR.

EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur viral recombinant dérivé de l'Adénovirus canin 2 (CAV2) sous forme d'un plasmide bactérien

A. Clonage du génome de CAV2 dans p poly II

Le génome de CAV 2 est cloné dans ppolyII SfiI-NotI 14 (Lathe et al., 1987, *supra*) et modifié pour générer des vecteurs recombinants en utilisant les sites adéquats suivant les mêmes procédés que ceux utilisés dans le cas de la manipulation d'Ad5. Les extrémités gauche (nucléotides 1 à 810 suivant la numérotation de la séquence D04368 de Genebank) et droite (nucléotides ~27600 à la fin) sont synthétisées par PCR entre les couples d'amorces oligonucléotidiques oTG6974 (SEQ ID NO: 8) et oTG6975 (SEQ ID NO: 9) et oTG6976 (SEQ ID NO: 10) et oTG6974, respectivement. Elles sont assemblées par l'intermédiaire du site *Pst*I introduit lors de la PCR à la suite des séquences virales, dans le cas de l'extrémité gauche, et cartographié à approximativement 1200 pb de la fin du génome, dans le cas de l'extémité droite. Des bactéries compétentes BJ5183 sont co-transformées avec le plasmide ainsi obtenu linéarisé par *Pst*I et l'ADN de CAV2. L'introduction des séquences virales manquantes (nucléotides 811 à 27600) est réalisée par

recombinaison homologue. Le génome de CAV2 porté par le plasmide résultant est excisé par l'intermédiaire des sites *Not*I introduits lors de la PCR puis transfecté dans une monocouche de cellules MDCK (ATCC CCL34). Les étapes suivantes sont décrites dans l'exemple 1.

B. Construction d'un vecteur adénoviral recombinant d'origine canine

L'ADN génomique de virus CAV2 (souche Toronto A 26/61 ; ATCC VR-800) est préparé par la technique classique (amplification sur lignée rénale de chien MDCK GHK ..., lyse des cellules, purification des virus par centrifugation sur chlorure de césium, traitement à la protéinase k et enfin extraction au phénol / chloroforme). Le génome CAV2, qui a une longueur de 31 kpb est introduit dans un vecteur plasmidique par recombinaison homologue. Pour ce faire, on isole les extrémités gauche et droite du génome CAV2 par PCR et digestion enzymatique en incorporant un site *Not*I immédiatement au-delà des ITRs 5' et 3'. Le vecteur pTG4457 est obtenu par introduction dans p poly II de la partie 5' du génome viral jusqu'au site *Bst*BI (position 870) suivie de la partie 3' à partir du site *Sal*I (position 27800). Le génome complet peut être reconstitué par cotransformation entre l'ADN génomique (100 à 500 ng) et pTG4457 digéré par *Bst*BI (10 à 100 ng). Le génome viral peut être excisé du vecteur précédent pTG5406 par digestion *Not*I. On vérifie que l'ADN est infectieux par transfection de 1 à 5 µg dans les cellules de chien MDCK ou GHK. On observe la production de plages.

Le vecteur recombinant est obtenu de la façon suivante :

L'extrémité gauche du CAV2 est sous clonée et modifiée de manière à déleter les séquences codantes E1A en totalité et E1B partiellement. Ceci est effectué par digestion *Nar*I puis réintroduction d'un fragment amplifié par PCR recouvrant la région d'encapsidation, la région promotrice E1A et le site d'initiation de la transcription. Les amorces sont conçues de manière à intégrer également un site de restriction unique *Xba*I. On obtient pTG5407 dans lequel on introduit au niveau du

site *Xba*I le gène CAT ou Lac Z (pTG5408). Ce dernier est digéré par *Xho*I et on insère la partie 3' du génome viral sous forme d'un fragment *Sal*I (position 27800 à la fin de l'ITR 3'). Le vecteur pTG5409 ainsi obtenu est linéarisé par *Sal*I et co-transformé dans *E.coli* BJ5183 avec le génome CAV-2 digéré par *Swa*I . On obtient un vecteur adénoviral d'origine canine portant le gène reporteur CAT à la place de la région E1.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:
(A) NOM: Transgene S.A.
(B) RUE: 11 rue de Molsheim
(C) VILLE: Strasbourg
(E) PAYS: France
(F) CODE POSTAL: 67082
(G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
(H) TELECOPIE: (33) 88 22 58 07

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau procede de preparation d'un vecteur viral

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 10

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:
(A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus humain
(B) SOUCHE: serotype 5
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6597

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCCGAATTCT TAATTAACAT CATCAATAAT ATACCTTA 38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 35 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus humain
(B) SOUCHE: serotype 5
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6598

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GACAGATCTG TCGACGTGGC AGGTAAGATC GATCA 35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 35 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: adenovirus humain
(B) SOUCHE: serotype 5
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6599

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AGGAGATCTG TCGACTCTCA AACATGTCTG CGGGT 35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 47 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Rous sarcoma virus
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5892

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTG TGTTGGAGGT CGCTGAG 47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 47 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Rous sarcoma virus
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5893

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT GGTGAATGGT CAAATGG 47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 25 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus humain
(B) SOUCHE: serotype 5
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5455

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC 25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 28 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus humain
(B) SOUCHE: serotype 5
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG5456

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC 28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 36 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus canin
(B) SOUCHE: CAV-2
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6974

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CAGGGATCCG CGGCCGCATC ATCAATAATA TACAGG 36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 29 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus canin
(B) SOUCHE: CAV-2
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6975

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CTGCTGCAGT CAGAAATGCT AGCAGGAGA 29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: adenovirus canin
(B) SOUCHE: CAV-2
(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligonucleotide de synthese OTG6976

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

TGCGGATCCA CAGACTAAGC GGAGGTA 27

Revendications

1. Procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant dérivé d'un virus parental dans le génome duquel est insérée une séquence d'ADN exogène, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome du virus parental et (ii) un second fragment d'ADN comprenant ladite séquence d'ADN exogène entourée de séquences flanquantes A et B homologues à (i).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le virus parental est sélectionné parmi le groupe constitué par les adénovirus, les rétrovirus, les virus associés aux adénovirus, les poxvirus et les virus de l'herpès.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine humaine, canine, aviaire, bovine, murine, ovine, porcine ou simienne ou encore un adénovirus hybride.

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine canine de type CAV-2.

5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine humaine de sérotype C.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le virus parental est un adénovirus d'origine humaine de type 5.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN exogène code pour un polypeptide d'intérêt thérapeutique sélectionné parmi le groupe constitué par les facteurs de coagulation, les hormones de croissance, les cytokines, les lymphokines, les polypeptides suppresseurs de tumeurs, les récepteurs cellulaires, les ligands de récepteurs

cellulaires, les inhibiteurs de protéases, les anticorps, les toxines, les immunotoxines, la dystrophine et les polypeptides intervenant dans les canaux ioniques cellulaires tels que la protéine CFTR.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les séquences flanquantes homologues A et B ont une longueur de 10pb à 10kb, avantageusement de 20 pb à 5kb, de préférence de 30 pb à 2 kb et de manière tout à fait préférée de 40 pb à 1kb.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le premier fragment d'ADN est linéarisé au niveau de la région d'insertion de la séquence exogène.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, pour la préparation d'un vecteur viral recombinant défectif pour la replication.

11. Procédé selon la revendication 10, pour la préparation d'un vecteur adénoviral recombinant dépourvu de tout ou partie d'au moins une région essentielle à la replication sélectionnée parmi les régions E1, E2 et E4.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le vecteur adénoviral recombinant est en outre dépourvu de tout ou partie de la région E3.

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, pour la préparation d'un vecteur viral recombinant d'au moins 20 kb.

14. Procédé selon la revendication 13, pour la préparation d'un vecteur viral recombinant d'au moins 30 kb.

15. Procédé selon les revendications 1 à 14, par recombinaison intermoléculaire entre (i) un premier fragment d'ADN comprenant tout ou partie dudit génome

du virus parental, (ii) un second fragment d'ADN comprenant une première partie de ladite séquence d'ADN d'intérêt munie à son extrémité 5' de ladite séquences flanquantes A et (iii) un troisième fragment d'ADN comprenant une deuxième partie de ladite séquence d'ADN d'intérêt munie à son extrémité 3' de ladite séquences flanquantes B ; lesdits seconds et troisièmes fragments d'ADN comportant une séquence homologues à leurs extrémités 3' et 5' respectives.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, pour introduire une modification par délétion, mutation et/ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides ou une séquence d'ADN exogène dans un génome viral.

17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que ladite cellule procaryote est dérivée d'une souche d'Escherichia coli recBC sbcBC.

18. Procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un vecteur viral recombinant obtenu en mettant en oeuvre un procédé selon l'une des revendications 1 à 17, selon lequel :

(a) on introduit ledit vecteur viral recombinant dans une cellule mammifère pour générer une cellule de mammifère transfectée,

(b) on cultive ladite cellule de mammifère transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule virale, et

(c) on récupère ladite particule virale de la culture cellulaire obtenue à l'étape (b).

19. Usage d'une particule virale infectieuse préparée selon la revendication 18 ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon l'une des revendications 1 à 17,

pour le traitement thérapeutique ou chirurgical du corps humain.

20. Usage selon la revendication 19 pour le traitement thérapeutique ou chirurgical du corps humain par thérapie génique.

21. Composition pharmaceutique comprenant une quantité thérapeutiquement efficace d'une particule virale infectieuse préparée selon la revendication 18 ou d'un vecteur viral préparé selon l'une des revendications 1 à 17, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

22. Usage d'une particule virale infectieuse préparée selon la revendication 18 ou d'un vecteur viral recombinant préparé selon l'une des revendications 1 à 17, pour l'expression d'une séquence d'ADN d'intérêt dans un système cellulaire.

23. Usage d'une souche d'*E. coli* recBC sbcBC pour le clonage de fragments d'ADN dans un vecteur plasmidique par recombinaison homologue intermoléculaire.

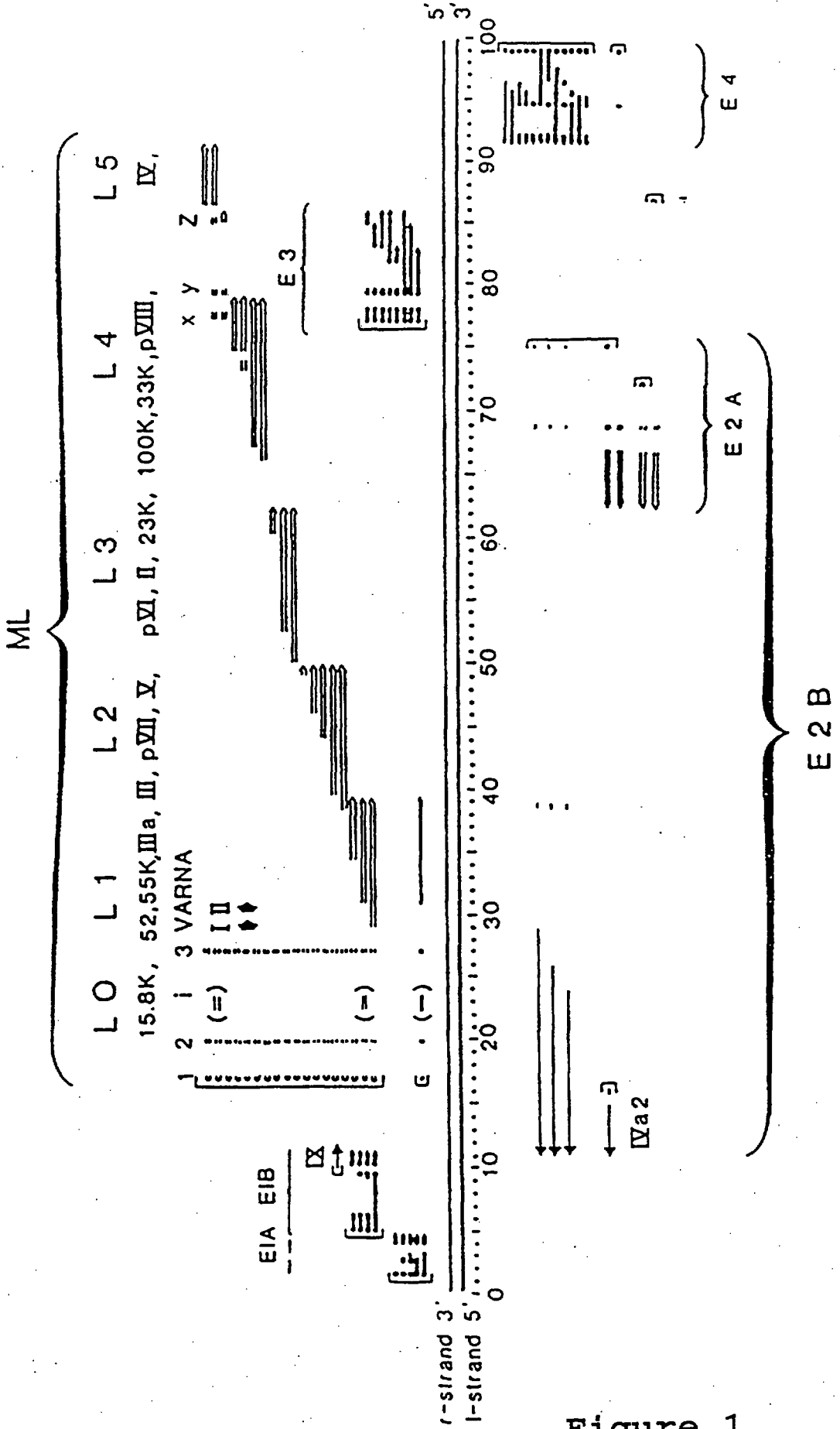

ML
L0 L1 L2 L3 L4 L5
15.8K, 52,55K,IIIa, III, pVII, V, pVI, II, 23K, 100K,33K,pVIII, IV,
1 2 i 3 VARNA
I II
x y z
E3
E4
E2A
E2B
EIA EIB
IX
IVa2
r-strand 3'
l-strand 5'
5'
3'
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Figure 1

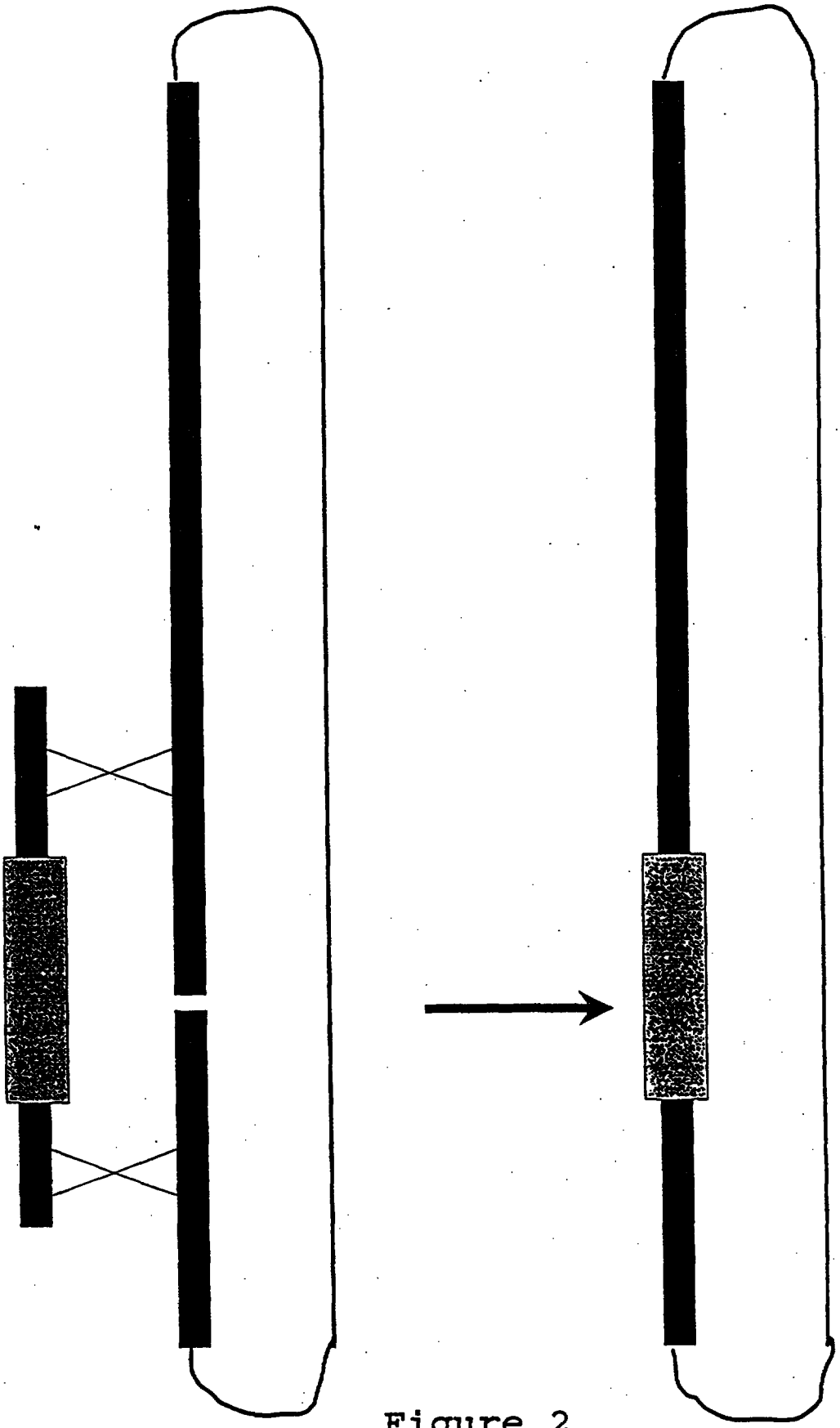


Figure 2

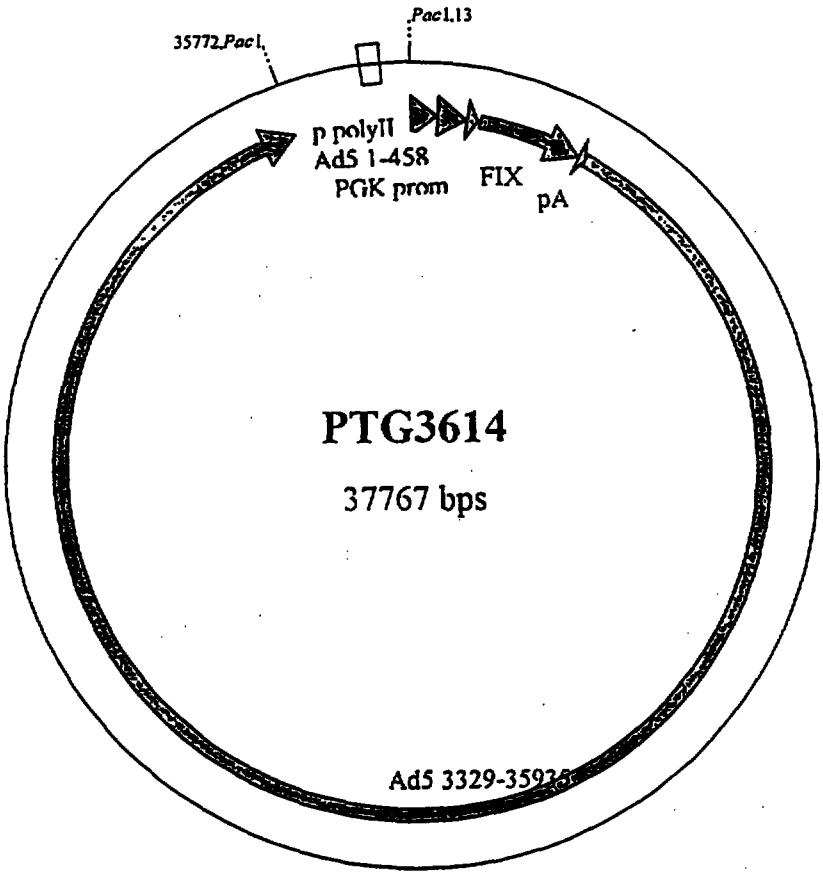

35772_Pac I
Pac I.13
p polyII
Ad5 1-458
PGK prom
FIX
pA
PTG3614
37767 bps
Ad5 3329-35935

Figure 3

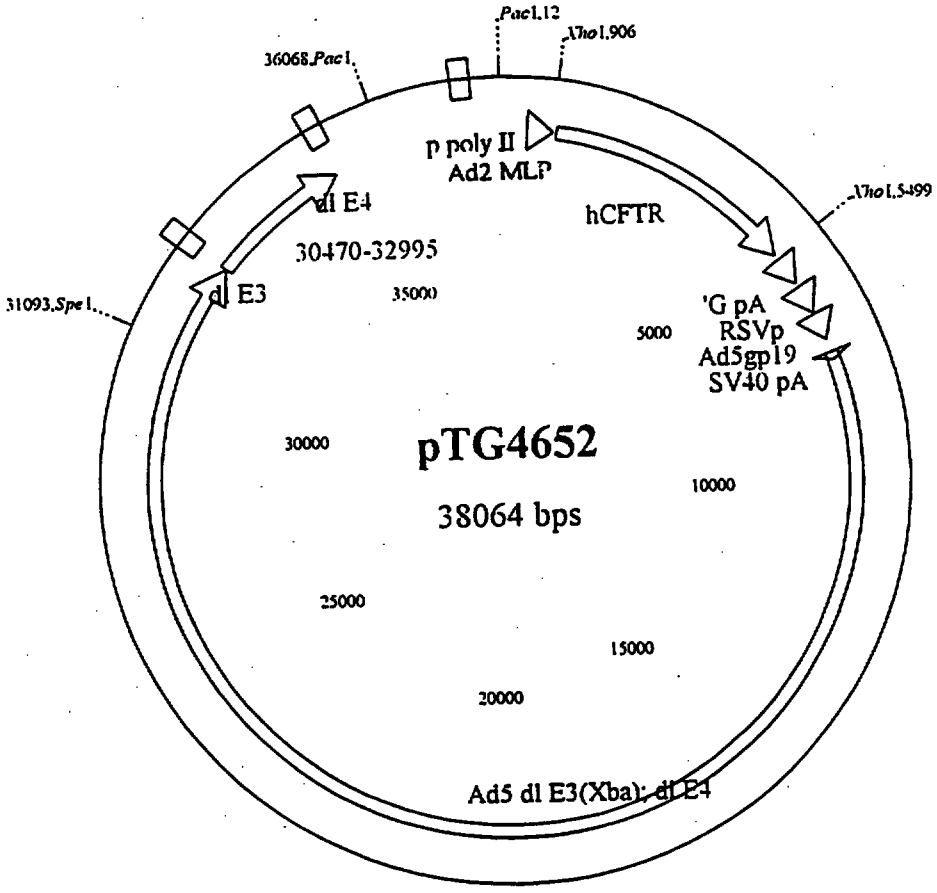

PacI.12
XhoI.906
36068.PacI
p poly II
Ad2 MLP
dl E4
hCFTR
XhoI.5499
30470-32995
dl E3
35000
31093.SpeI
'G pA
RSVp
Ad5gp19
SV40 pA
5000
30000
pTG4652
10000
38064 bps
25000
15000
20000
Ad5 dl E3(Xba); dl E4

Figure 4

PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) **Classification internationale des brevets** 6 : C12N 15/86, 15/10, 7/00, 7/01 — A1

(11) **Numéro de publication internationale:** WO 96/17070

(43) **Date de publication internationale:** 6 juin 1996 (06.06.96)

(21) **Numéro de la demande internationale:** PCT/FR95/01590

(22) **Date de dépôt international:** 1er décembre 1995 (01.12.95)

(30) **Données relatives à la priorité:**
94/14470 1er décembre 1994 (01.12.94) FR

(71) **Déposant** *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(72) **Inventeurs; et**
(75) **Inventeurs/Déposants** *(US seulement)*: CHARTIER, Cécile [FR/FR]; 14, rue du Dôme, F-67000 Strasbourg (FR). DEGRYSE, Eric [FR/FR]; 18, rue du Maréchal-Lefèbvre, F-67100 Strasbourg (FR).

(74) **Mandataire:** WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) **Etats désignés:** AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée
Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

RTMP's copy

SG 9611212-3

(54) **Title:** METHOD OF PREPARING A VIRAL VECTOR BY HOMOLOGOUS INTERMOLECULAR RECOMBINATION

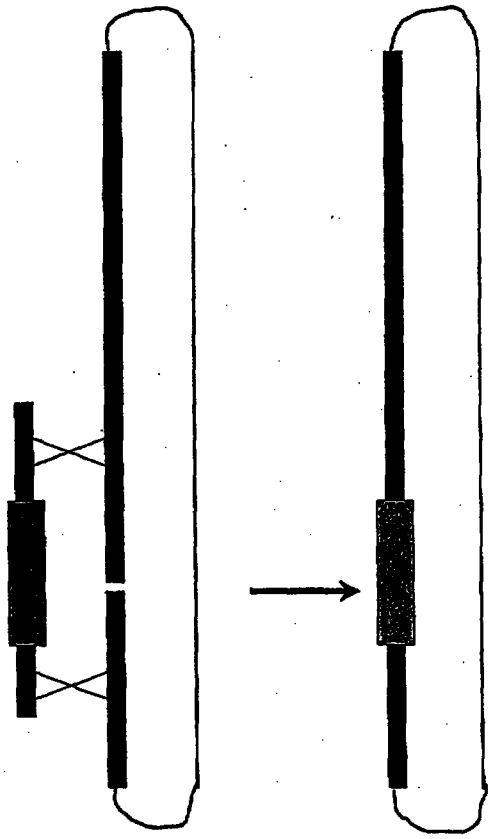
(54) **Titre:** PROCEDE DE PREPARATION D'UN VECTEUR VIRAL PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE INTERMOLECULAIRE

(57) **Abstract**

Method of preparing within a procaryotic cell a recombinant viral vector by intermolecular homologous recombination, method of preparing an infectious viral particle containing such a vector and pharmaceutical composition comprising said vector or particle. The invention also concerns the therapeutic use of said vector or particle, especially in human gene therapy.

(57) **Abrégé**

L'invention concerne un procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant par recombinaison homologue intermoléculaire, un procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un tel vecteur, ainsi qu'une composition pharmaceutique les comprenant. L'invention couvre également leur usage thérapeutique, notamment dans le cadre de la thérapie génique appliquée à l'homme.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	**GB**	Royaume-Uni	**MR**	Mauritanie
AU	Australie	**GE**	Géorgie	**MW**	Malawi
BB	Barbade	**GN**	Guinée	**NE**	Niger
BE	Belgique	**GR**	Grèce	**NL**	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	**HU**	Hongrie	**NO**	Norvège
BG	Bulgarie	**IE**	Irlande	**NZ**	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	**IT**	Italie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**JP**	Japon	**PT**	Portugal
BY	Bélarus	**KE**	Kenya	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**KG**	Kirghizistan	**RU**	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SD**	Soudan
CG	Congo			**SE**	Suède
CH	Suisse	**KR**	République de Corée	**SI**	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kazakhstan	**SK**	Slovaquie
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Sénégal
CN	Chine	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LU**	Luxembourg	**TG**	Togo
CZ	République tchèque	**LV**	Lettonie	**TJ**	Tadjikistan
DE	Allemagne	**MC**	Monaco	**TT**	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	**MD**	République de Moldova	**UA**	Ukraine
ES	Espagne	**MG**	Madagascar	**US**	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	**ML**	Mali	**UZ**	Ouzbékistan
FR	France	**MN**	Mongolie	**VN**	Viet Nam
GA	Gabon				

9611212-3

PCT WORLD ORGANISATION FOR INTELLECTUAL PROPERTY
International Office
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International patent classification[6] : C12N 15/86, 15/10, 7/00, 7/01 — A1

(11) International publication number: WO 96/17070
(43) International publication date: 6 June 1996 (06.06.96)

(21) International application number: PCT/FR95/01590

(22) International filing date: 1st December 1995 (01.12.95)

(30) Data relating to the priority:
94/14470 1st December 1994 (01.12.94) FR

(71) Applicant (for all designated States except US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (US only): Cécile CHARTIER [FR/FR]; 14, rue du Dôme, F-67000 Strasbourg (FR). Eric DEGRYSE [FR/FR]; 18, rue du Maréchal-Lefèbvre, F-67100 Strasbourg (FR).

(74) Representative: Jacques WARCOIN; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

(81) Designated States: AU, CA, JP, SG, US, European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Published
With the International Search Report.

Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.

As printed

(54) Title: METHOD OF PREPARING A VIRAL VECTOR BY HOMOLOGOUS INTERMOLECULAR RECOMBINATION

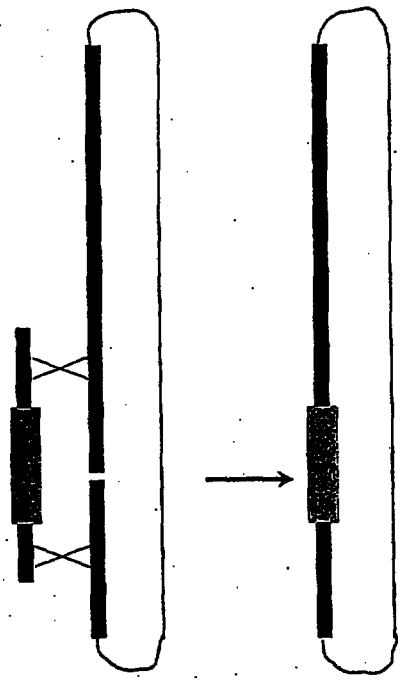
(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'UN VECTEUR VIRAL PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE INTERMOLECULAIRE

(57) Abstract

Method of preparing within a procaryotic cell a recombinant viral vector by intermolecular homologous recombination, method of preparing an infectious viral particle containing such a vector and pharmaceutical composition comprising said vector or particle. The invention also concerns the therapeutic use of said vector or particle, especially in human gene therapy.

(57) Abrégé

L'invention concerne un procédé pour préparer dans une cellule procaryote un vecteur viral recombinant par recombinaison homologue intermoléculaire, un procédé pour préparer une particule virale infectieuse contenant un tel vecteur, ainsi qu'une composition pharmaceutique les comprenant. L'invention couvre également leur usage thérapeutique, notamment dans le cadre de la thérapie génique appliquée à l'homme.



ONLY FOR INFORMATION

Codes used to identify the PCT member States on the flyleaves of the brochures in which international applications made under the PCT are published.

AT	Austria
AU	Australia
BB	Barbados
BE	Belgium
BF	Burkina Fasso
BG	Bulgaria
BJ	Benin
BR	Brazil
BY	Belarus
CA	Canada
CF	Central African Republic
CG	Congo
CH	Switzerland
CI	Ivory Coast
CM	Cameroon
CN	China
CS	Czechoslovakia
CZ	Czech Republic
DE	Germany
DK	Denmark
ES	Spain
FI	Finland
FR	France
GA	Gabon
GB	United Kingdom
GE	Georgia
GN	Guinea
GR	Greece
HU	Hungary
IE	Ireland
IT	Italy
JP	Japan
KE	Kenya
KG	Kyrghyzstan
KP	Democratic People's Republic of Korea
KR	Republic of Korea
KZ	Kazakhstan
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LU	Luxembourg
LV	Latvia
MC	Monaco
MD	Republic of Moldova
MG	Madagascar
ML	Mali
MN	Mongolia
MR	Mauritania
MW	Malawi
NE	Niger
NL	Netherlands
NO	Norway
NZ	New Zealand
PL	Poland
PT	Portugal
RO	Romania
RU	Russian Federation
SD	Sudan
SE	Sweden
SI	Slovenia
SK	Slovakia
SN	Senegal
TD	Chad
TG	Togo
TJ	Tajikistan
TT	Trinidad and Tobago
UA	Ukraine
US	United States of America
UZ	Uzbekistan
VN	Vietnam

Method for the preparation of a viral vector by intermolecular homologous recombination

The present invention relates to a method for preparing a viral vector *in vitro* in a prokaryotic cell and to its application for producing an infectious viral particle intended for therapeutic use, and especially for use in gene therapy.

The possibility of treating human diseases by gene therapy has changed in a few years from the stage of theoretical considerations to that of clinical applications. The first protocol applied to man was initiated in the US in September 1990 on a patient who was genetically immunodeficient as a result of a mutation affecting the gene coding for adenine deaminase (ADA). The relative success of this first experiment encouraged the development of new gene therapy protocols for various genetic or acquired diseases (infectious diseases, and viral diseases in particular, such as AIDS, or cancers). The large majority of the protocols described hitherto employ viral vectors to transfer the therapeutic gene to the cells to be treated and to express it therein.

To date, retroviral vectors are among the ones most widely used on account of the simplicity of their genome. However, apart from their restricted capacity for cloning, they present two major drawbacks which limit their systematic use: on the one hand they chiefly infect dividing cells, and on the other hand, as a result of their integration at random in the genome of the host cell, the risk of insertional mutagenesis is not insignificant. For this reason, many scientific teams have endeavored to develop other types of vector, among which those originating from adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), poxviruses and herpesviruses may be mentioned. Generally speaking, their organization and their infection cycle are amply described in the literature available to a person skilled in the art.

In this connection, the use of adenoviral vectors has been seen to be a promising alternative. Adenoviruses

have been demonstrated in many animal species, have a broad host range, have little pathogenicity and do not present the drawbacks associated with retroviruses since they replicate in resting cells and are nonintegrative. As a guide, their genome consists of a linear, double-stranded DNA molecule of approximately 36 kb carrying more than about thirty genes, both early genes necessary for viral replication (E1 to E4) and late structural genes (L1 to L5) (see Figure 1).

Generally speaking, the adenoviral vectors are obtained by deletion of at least one portion of the viral genes (in particular of the E1 region essential for viral replication), which are replaced by the therapeutic genes. Consequently, they are propagated in a cell line, termed complementation line, which supplies *in trans* the deleted viral functions to generate a viral vector particle which is defective for replication but capable of infecting a host cell. The line 293, established from human embryonic kidney cells, which complements adenoviruses that are defective for the E1 function (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., *36*, 59-72), is commonly used.

The techniques of preparation of adenoviral vectors are amply described in the literature (see, in particular, Graham and Prevec, Methods in Molecular Biology, Vol. 7; Gene Transfer and Expression Protocols; Ed: E.J. Murray, 1991, The Human Press Inc., Clinton, NJ). One of the methods most often employed consists in generating the recombinant adenoviral vector in complementation cells transfected with a bacterial plasmid carrying the gene of interest subcloned within its adenoviral insertion region and the adenoviral genome. Generally, the latter is cleaved with a suitable restriction enzyme so as to reduce the infectivity of the parent viral DNA and to increase the efficiency of isolation of the recombinant adenoviruses. However, a substantial background of infectious viral particles of parenteral origin is nevertheless observed, which necessitates an especially arduous task of analysis of the plaques obtained (arduous from a time and cost standpoint, since

each plaque has to be amplified and analyzed individually). This is problematical when the parent virus displays a selective advantage over the recombinant adenovirus, for example when the latter replicates more slowly than the parent virus as a result of the insertion of a large-sized gene of interest (factor VIII, dystrophin), reducing proportionately the probability of obtaining it.

Ligation between two DNA fragments generated by the standard techniques of molecular biology and carrying, respectively, the 5' and 3' portions of the recombinant adenoviral vector may also be employed. Transfection of the ligation mixture into the complementation cells makes it possible in theory to encapsidate the genome of the recombinant adenovirus to form an infectious particle. This technology is of low efficiency and its application limited by the restricted number of suitable and unique restriction sites.

It has now been shown to be possible to generate a recombinant adenoviral vector in *Escherichia coli* (*E. coli*) by intermolecular homologous recombination between a plasmid containing the genome of a type 5 adenovirus and an insert carrying an exogenous DNA sequence surrounded by adenoviral sequences A and B (Figure 2). This method leads to the replacement in the adenoviral genome of the targeted region located between A and B by the exogenous sequence. Transfection of the recombinant adenoviral vector thus generated into an appropriate complementation line gives rise to an infectious viral particle which may be used without a prior purification step to infect a host cell. The background (contamination with parent viral particles) is reduced or even abolished. In addition, it was found, surprisingly, that the use of E. coli recBC sbcBC strains is especially advantageous for promoting intermolecular recombination between any two DNA fragments.

The method of the present invention is based on exploitation of the endogenous enzymatic activities of the prokaryotic cells involved in homologous

recombination. This intermolecular recombination technique had already been described for the cloning of small inserts into bacterial vectors (Bubeck et al., 1993, Nucleic Acids Research, *21*, 3601-3602) or for generating hybrid genes by intramolecular recombination (Calogero et al., 1992, FEMS Microbiology Letters, *97*, 41-44; Caramori et al., 1991, Gene, *98*, 37-44). However, this recombination technology had never been employed in prokaryotic cells to generate infectious viral vectors (capable of being encapsidated into infectious viral particles).

The method of the invention has the advantage over the previous techniques of being rapid and especially efficient, and of requiring only a small number of manipulations *in vitro*. Furthermore, it may be employed with DNA fragments generated by PCR (polymerase chain reaction), thereby avoiding the steps of subcloning of the exogenous DNA sequence into the insertion region of the viral genome. Lastly, it provides an advantageous solution to the problem of background which is clearly identified in the literature. Consequently, it proves especially efficacious for vectors originating from large-sized viruses or viruses into which the insertion of a large-sized exogenous DNA sequence is envisaged.

Accordingly, the subject of the present invention is a method for preparing, in a prokaryotic cell, a recombinant viral vector derived from a parent virus into the genome of which an exogenous DNA sequence is inserted, by intermolecular recombination between (i) a first DNA fragment comprising all or part of said genome of the parent virus and (ii) a second DNA fragment comprising said exogenous DNA sequence surrounded by flanking sequences A and B which are homologous to (i).

For the purposes of the present invention, a recombinant viral vector is obtained from a parent virus modified so as to carry at a suitable site of the viral genome and to express an exogenous DNA sequence. The parent viruses capable of being used in the context of the invention are, for example, alphaviruses,

retroviruses, poxviruses, and in particular vaccinia or canarypox virus, herpesviruses, adeno-associated viruses (AAV) and most especially adenoviruses.

In this connection, the choice of parent adenovirus is very wide. It can be an adenovirus of human, canine, avian, bovine, murine, ovine, porcine or simian origin, or alternatively a hybrid adenovirus comprising adenoviral genome fragments of different origins. Very special preference will be given to a serotype C adenovirus of human origin and preferably a type 2 or 5 adenovirus, or alternatively to an adenovirus of animal origin of the CAV-1 or CAV-2 (canine), DAV (avian) or alternatively BAd (bovine) type. These viruses and their genome are described in the literature (see, for example, Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., *128*, 171-176; Spibey and Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., *70*, 165-172; Jouvenne et al., 1987, Gene, *60*, 21-28; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., *76*, 93-102).

The objective of a method according to the invention is to prepare a recombinant viral vector for the transfer of an exogenous DNA sequence to a host cell and its expression therein. "Exogenous DNA sequence" is understood to mean a nucleic acid which comprises coding sequences and regulatory sequences permitting the expression of said coding sequences, and in which the coding sequences are sequences which are not normally present in the genome of a parent virus employed in the present invention or, if they are present, are in a different genomic context. In the context of the invention, the exogenous DNA sequence perhaps [sic] composed of one or more genes. The regulatory sequences may be of any origin.

Preferably, the exogenous DNA sequence can code for an antisense RNA and/or an mRNA which will then be translated into a protein of interest. It may be of the genomic type, of the complementary DNA (cDNA) type or of mixed type (minigene, in which at least one intron is deleted). It may code for a mature protein, a precursor of a mature protein, in particular a precursor intended

to be secreted and, as a result, comprising a signal peptide, a chimeric protein originating from the fusion of sequences of diverse origins or a mutant of a natural protein displaying improved or modified biological properties. Such a mutant may be obtained by mutation, deletion, substitution and/or addition of one or more nucleotide(s) of the gene coding for the natural protein.

In the context of the present invention, it can be advantageous to use:

- the genes coding for cytokines or lymphokines, such as interferons α, β and γ, interleukins, and in particular IL-2, IL-6 or IL-10, tumor necrosis factors (TNF) and colony stimulating factors (CSF);
- the genes coding for cell receptors, such as the receptors recognized by pathogenic organisms (viruses, bacteria or parasites), preferably by the HIV virus (human immunodeficiency virus), or ligands for cell receptors;
- the genes coding for growth hormones (HGF);
- the genes coding for coagulation factors, such as factor VIII and factor IX;
- the gene coding for dystrophin or minidystrophin;
- the gene coding for insulin;
- the genes coding for polypeptides participating directly or indirectly in cellular ion channels, such as the CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) protein;
- the genes coding for antisense RNAs or proteins capable of inhibiting the activity of a protein produced by a pathogenic gene present in the genome of a pathogenic organism, or by a cellular gene whose expression is deregulated, for example an oncogene;
- the genes coding for a protease inhibitor such as α_1-antitrypsin or an inhibitor of a viral protease;
- the genes coding for variants of pathogenic proteins which have been mutated in such a way as to impair their biological function, such as, for example, trans-dominant variants of the HIV virus TAT protein

which are capable of competing with the natural protein for binding to the target sequence, thereby preventing the replication of HIV;

- the genes coding for antigenic epitopes so as to increase the immunity of the host cell;
- the genes coding for polypeptides having anticancer properties, and in particular tumor suppressors such as the p53 protein;
- the genes coding for proteins of the major histocompatibility complex classes I and II, as well as the genes coding for the proteins that regulate the expression of these genes;
- the genes coding for cellular enzymes or those produced by pathogenic organisms; and
- suicide genes. The HSV-1 TK gene may be mentioned more especially. The viral TK enzyme displays a markedly greater affinity than the cellular TK enzyme for certain nucleoside analogs (such as acyclovir or ganciclovir). It converts them to monophosphated molecules, which are themselves convertible by the cellular enzymes to nucleotide precursors, which are toxic. These nucleotide analogs can be incorporated in DNA molecules in the process of synthesis, hence mainly in the DNA of cells undergoing replication. This incorporation enables dividing cells such as cancer cells to be destroyed specifically.
- the genes coding for an antibody, an antibody fragment or an immunotoxin.
- reporter genes such as the LacZ gene coding for β-galactosidase, or the luciferase gene.

This list is not limiting, and other genes may naturally be employed as well.

Moreover, an exogenous DNA sequence employed in the present invention may comprise, in addition, a nontherapeutic gene, for example a gene coding for a selectable marker enabling the transfected host cells to be selected or identified. There may be mentioned the *neo* gene (coding for neomycin phosphotransferase) conferring

resistance to the antibiotic G418, the *dhfr* (dihydrofolate reductase) gene, the CAT (chloramphenicol acetyltransferase) gene, the pac (puromycin acetyltransferase) gene or alternatively the *gpt* (xanthine:guanine phosphoribosyltransferase) gene.

Naturally, a gene employed in the present invention may be placed under the control of elements suitable for its expression in a host cell. "Suitable elements" are understood to mean the set of elements necessary for its transcription into RNA (antisense RNA or mRNA) and for the translation of an mRNA into protein. Among elements necessary for transcription, the promoter assumes special importance. The latter can be a constitutive promoter or a regulable promoter, and it may be isolated from any gene of eukaryotic or even of viral origin. Alternatively, it can be the natural promoter of the gene in question. Generally speaking, a promoter employed in the present invention may be modified so as to contain regulatory sequences. As examples of tissue-specific promoters, there may be mentioned those of the immunoglobulin genes when it is sought to target the expression into lymphocytic host cells, and of the α_1-antitrypsin gene for a liver-specific expression. The constitutive promoters of the HSV-1 TK (herpesvirus type 1 thymidine kinase) and of the murine or human PGK (phosphoglycerate kinase) gene, the SV40 (simian virus 40) early promoter, a retroviral LTR or alternatively the adenoviral MLP promoter, in particular of human adenovirus type 2, may also be mentioned.

The method according to the invention employs an intermolecular homologous recombination mechanism. Generally speaking, it consists of the exchange of homologous sequences between two DNA fragments. These sequences may be identical or substantially homologous. In other words, the degree of homology of the sequences A and B with the corresponding portion of the first DNA fragment may be variable, but must be sufficient to permit intermolecular recombination. For the purposes of the present invention, it is preferable for it to be

greater than 70%, advantageously greater than 80%, preferably greater than 90%, and as an absolute preference in the region of 100%. Furthermore, a short region of homology may be sufficient (at least 10 consecutive nucleotides in common between the sequences A and B and their homologous sequences in the first DNA fragment). In the context of the present invention, the length of the sequences A and B is preferably between 10 bp and 10 kb, advantageously 20 bp and 5 kb, preferably 30 bp and 2 kb, and as an absolute preference 40 bp and 1 kb.

According to an advantageous embodiment, a method according to the invention leads to the replacement of the genetic material localized between the sequences of the first DNA fragment which are homologous to the sequences A and B by the exogenous sequence. This intermolecular exchange enables a circular recombinant viral vector to be generated in the form of a prokaryotic vector (plasmid, cosmid or phage) permitting its manipulation and/or its propagation in the prokaryotic cell. An embodiment of the mechanism employed in the context of the present invention is illustrated in Figure 2.

Although the insertion region of the exogenous sequence may be located in any position of the viral genome, it is preferable to avoid the regions acting *in cis* necessary for replication. These regions comprise, in particular, the 5' and 3' LTRs as well as the encapsidation signal in the case of retroviruses, and the 5' and 3' ITRs and the encapsidation region as regards adenoviruses. It would appear that the insertion region may be directed into a variety of positions in accordance with the chosen homologous sequences A and B.

As stated above, the first DNA fragment comprises all or part of the genome of the parent virus employed in the context of the invention. This may be the genome of a wild-type virus or the genome of a virus derived therefrom, modified by deletion, addition and/or substitution of one or more nucleotides. In particular, one or more genes may be wholly or partially deleted from the genome in question.

The first DNA fragment is preferably included in a conventional vector. The choice of the latter is very wide, but pBR322, p polyII or alternatively p polyIII*I (Lathe et al., 1987, Gene, 57, 193-201) may be mentioned more especially. According to an advantageous embodiment of the method according to the invention, the first DNA fragment is preferably linearized in the region in which the targeting of the insertion is envisaged. In particular, it may be cleaved with one or more restriction enzymes whose sites are localized between the sequences of the first DNA fragment which are homologous to the sequences A and B, but also within these latter, although this embodiment is not preferred. The choice of restriction sites to be used according to the parent virus adopted is within the capacity of a person skilled in the art. Advantageously, it will be preferable to use sites which are not strongly represented in the first DNA fragment, and especially unique sites. Moreover, such sites may also be created by the standard techniques of directed mutagenesis.

The second DNA fragment employed in the present invention carries, in particular, the exogenous DNA sequence surrounded by the sequences A and B involved in the intermolecular recombination. It is preferable to employ a linear DNA fragment. It may be generated by PCR, excised from any vector or produced synthetically or by any conventional method in the field of the art. As an example, a second DNA fragment employed in the context of the present invention may be obtained by amplification of the exogenous DNA sequence from a vector of the prior art or from a genomic library or from an appropriate cDNA using suitable primers equipped at their 5′ ends with the sequences A and B. In addition, a second DNA fragment may also comprise plasmid sequences at its 5′ and 3′ ends, which may optionally be used by way of sequences A and B provided they are homologous to the plasmid sequences contained in the first DNA fragment.

In accordance with the objectives pursued by the present invention, a method according to the invention is

carried out for the preparation of a recombinant viral vector which is defective for replication. This term denotes a vector incapable of completing an autonomous infectious cycle in a host cell. Generally, the genome of these defective vectors lacks one or more genes essential for replication, early genes and/or late genes. They may be wholly or partially deleted or rendered nonfunctional by mutation (addition, deletion and/or substitution of one or more nucleotides). In this connection, a method according to the invention can enable a recombinant adenoviral vector lacking all or part of the E1, E2, E3 and/or E4 regions to be prepared.

By way of illustration, the following embodiments may be mentioned. When the intention is to prepare, in a prokaryotic cell, a recombinant adenoviral vector derived from a type 5 human adenovirus (Ad5) in which the insertion of an exogenous DNA sequence in place of the E1 region is envisaged, it is possible to employ (i) a vector containing the Ad5 genome cleaved with the enzyme *Cla*I (restriction site located at position 918 of the Ad5 genome, as disclosed in the Genebank databank under the reference M73260), and (ii) a DNA fragment comprising a sequence A homologous to the adenoviral encapsidation region, the exogenous DNA sequence followed by a sequence B homologous to the sequence coding for the pIX protein. Moreover, the use of a vector carrying the adenoviral genome cleaved with the enzyme *Spe*I (position 27082 of the Ad5 genome) and of a DNA fragment comprising a sequence A homologous to the 5′ end of the E2 region, the exogenous DNA sequence and a sequence B homologous to the 3′ end of the E4 region will enable a recombinant adenoviral vector to be prepared in which the exogenous DNA sequence is inserted in place of the E3 region. Naturally, these particular embodiments are mentioned only as examples. Lastly, the method according to the invention may be used to introduce deletions, mutations and/or substitutions into a particular region of a viral genome.

The present invention proves especially advantageous when the intention is to prepare a recombinant

viral vector of at least 20 kb, and as an absolute preference of at least 30 kb, and more especially in the case of a vector having a genome whose length is from 80 to 120% of that of the genome of the corresponding wild-type virus, in particular from 90 to 110% and preferably from 95 to 105%.

According to another embodiment, a method according to the invention may also be employed to insert at least two DNA fragments within the viral genome, by intermolecular recombination between (i) a first DNA fragment comprising all or part of said genome of the parent virus, (ii) a second DNA fragment comprising a first portion of said exogenous DNA sequence equipped at its 5′ end with said flanking sequences [sic] A and (iii) a third DNA fragment comprising a second portion of said exogenous DNA sequence equipped at its 3′ end with said flanking sequences [sic] B; said second and third DNA fragments containing a homologous sequence overlapping at their respective 3′ and 5′ ends. As a guide, these sequences which are homologous between the second and third DNA fragments satisfy the same criteria of homology and of length as the sequences A and B. This specific embodiment is especially advantageous for the cloning of large-sized exogenous sequences.

A method according to the invention may be carried out in any prokaryotic cell, and in particular in a bacterium derived from an *Escherichia coli* strain. However, it is most especially preferable to employ a recBC sbcBC strain such as, for example, the strains CES200, CES201, W5449 and BJ5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol., *166*, 557-580).

A procedure typical of a method according to the invention comprises the following steps:

(a) a first DNA fragment and (ii) a second DNA fragment, as are defined above, are cointroduced or introduced separately into a prokaryotic cell,

(b) the prokaryotic cell obtained in step (a) is cultured under suitable conditions to permit the generation of the recombinant viral vector by

intermolecular recombination, and

(c) the recombinant viral vector is recovered.

In the context of a method according to the invention, the amounts of first and second DNA fragments may vary. It is preferable to employ a concentration of second fragment which is 10 times as large as that of the first fragment. The introduction of the DNA fragments into a prokaryotic cell and the recovery of the vector from these same cells are carried out according to the general techniques of genetic engineering and of molecular cloning detailed in Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

The present invention also relates to a method for preparing an infectious viral particle containing a recombinant viral vector obtained by carrying out a method according to the invention, according to which:

(a) said recombinant viral vector is introduced into a mammalian cell to generate a transfected mammalian cell,

(b) said transfected mammalian cell is cultured under suitable conditions to permit the production of said viral particle, and

(c) said viral particle is recovered from the cell culture obtained in step (b).

The cells may be transfected according to the standard techniques well known to a person skilled in the art. The calcium phosphate technique, the DEAE-dextran technique, electroporation, methods based on osmotic shock, microinjection or methods based on the use of liposomes may be mentioned in particular. According to a preferred embodiment, the mammalian cell is advantageously a complementation cell, and in particular the 293 cell in the context of a vector derived from an adenovirus. The viral particles may be recovered from the culture supernatant, but also from the cells according to conventional protocols.

The present invention also covers the use of an infectious viral particle or of a recombinant viral

vector prepared according to a method according to the invention, for the therapeutic or surgical treatment of the human body, and in particular by gene therapy. A method according to the invention is intended more especially for the preventive or curative treatment of diseases such as genetic diseases (hemophilia; thalassemias, emphysema, Gaucher's disease, cystic fibrosis, Duchêne's [sic] or Becker's myopathy, etc.), cancers and viral diseases (AIDS, herpes infections or infections caused by cytomegalovirus or by papillomavirus). For the purposes of the present invention, the vectors and viral particles prepared by a method according to the invention may be introduced either *in vitro* into a host cell removed from the patient, or directly *in vivo* into the body to be treated. Preferably, the host cell is a human cell, and preferably a lung, fibroblast, muscle, liver or lymphocytic cell or a cell of the hematopoietic line.

The present invention also relates to a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an infectious viral particle or of a recombinant viral vector prepared according to a method according to the invention, in combination with a vehicle which is acceptable from a pharmaceutical standpoint. Such a pharmaceutical composition may be prepared according to the techniques commonly employed and administered by any known administration route, for example systemically (in particular intravenously, intratracheally, intraperitoneally, intramuscularly, subcutaneously, intratumorally or intracranially) or by aerosolization or intrapulmonary instillation.

Lastly, the subject of the present invention is also the use of an infectious viral particle or of a recombinant viral vector prepared according to a method according to the invention, for the expression of a DNA sequence of interest in a cell system.

The present invention is described more completely by reference to the figures which follow and by means of the examples which follow.

Figure 1 is a diagrammatic representation of the human adenovirus type 5 genome (shown in arbitrary units from 0 to 100), indicating the location of the different genes.

Figure 2 illustrates a method of intermolecular recombination between two DNA fragments. The plasmid sequences are represented by a thin line, the viral sequences by a thick line and the exogenous sequence by a shaded box.

Figure 3 is a diagrammatic representation of the vector pTG3614, corresponding to p polyII into which is cloned the genome of a recombinant adenovirus modified in the E1 region by insertion of a cassette for the expression of the human FIX gene.

Figure 4 is a diagrammatic representation of the vector pTG4652, corresponding to p polyII into which is cloned the genome of a recombinant adenovirus modified in the E1, E3 and E4 regions by insertion of a cassette for the expression of the human CF gene and partial deletions.

EXAMPLES

The examples which follow illustrate just one embodiment of the present invention.

The constructions described below are carried out according to the general techniques of genetic engineering and molecular biology detailed in Maniatis et al. (1989, *supra*). 5' protruding restriction sites may be converted to blunt sites by treatment with the large Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase, whereas 3' protruding sites are treated with T4 polymerase. As regards the steps of PCR amplification, the protocol as described in PCR Protocols - A guide to methods and applications (1990, ed. Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press Inc.) is applied. Cells are transfected by conventional methods and are cultured according to the supplier's recommendations. The fragments inserted into the different constructions described below are indicated precisely according to their position in the Ad5 genome as disclosed in the Genebank databank under

the reference M73260.

EXAMPLE 1: Construction of a recombinant viral vector derived from a type 5 human adenovirus in the form of a bacterial plasmid

A. *Cloning of the adenovirus 5 (Ad5) genome into p polyII*

The left-hand end of the Ad5 genome (nucleotides 1 to 935) is synthesized by PCR using the oligonucleotide primers oTG6597 (SEQ ID NO: 1) and oTG6598 (SEQ ID NO: 2). The first primer hybridizes with the first 21 nucleotides of the 5' ITR, and possesses a *Pac*I site immediately upstream of the viral sequences and an *Eco*RI site used for the cloning. The second primer enables *Sal*I and then *Bgl*II sites to be introduced downstream of the viral sequences. The template utilized in this reaction is Ad5 genomic DNA prepared according to conventional methods. The fragment thus amplified is digested with *Eco*RI and *Bgl*II [sic] and cloned into the plasmid p polyII (Lathe et al., 1987, *supra*) previously cleaved with these same two restriction enzymes, to give pTG1692.

The DNA fragment corresponding to the right-hand end of the Ad5 genome (nucleotides 35103 to 35935) is prepared according to the same principle, using the oligonucleotide pair oTG6599 (SEQ ID NO: 3) and oTG6597 (SEQ ID NO: 1). pTG1693 is constructed by inserting the amplified fragment, digested with *Eco*RI and *Bgl*II, into the same sites of p polyII. A *Bgl*II-*Bam*HI fragment carrying the amplified sequences is excised from pTG1693 so as to introduce it into the *Bgl*II site of pTG1692 downstream of the adenoviral 5' sequences. pTG3601 thereby obtained is linearized between the left-hand and right-hand ends of the Ad5 genome by digestion with restriction enzymes *Bgl*II or *Sal*I. The ends thus generated are blunted by the action of the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I. BJ5183 bacteria (Hanahan, 1983 *supra*), made competent by calcium chloride treatment, are cotransformed with the above preparation and the Ad5 genomic DNA. The colonies obtained are analyzed by restriction mapping. One clone is selected, designated

pTG3602, generated by intermolecular homologous recombination, in which the adenoviral sequences (nucleotides 936 to 35102) have been inserted between the two fragments produced by PCR, so as to generate a plasmid vector comprising the complete Ad5 genome - pTG3602 is produced in C600 bacteria (Huynh et al., 1985 DNA cloning, Volume 1, ed. Glover, IRL Press Limited: Oxford, England pp. 56-110).

B. Evaluation of the infectious power of pTG3602

The viral genome is liberated by the action of the restriction enzyme *Pac*I. 293 cells cultured in a monolayer are transfected with the product of this digestion by the calcium phosphate precipitation technique. It is also possible to use other sensitive cells, for example A549 cells (ATCC CCL185). The cells are grown under agar for 9 to 14 days, during which period the appearance of lytic plaques on the cell lawn testifies to the production of infectious viral particles, and hence to the capacity of the Ad5 genome originating from pTG3602 to replicate.

C. Construction of a defective recombinant adenoviral vector in which the exogenous gene replaces the E1 early region.

A plasmid is used in which the LacZ reporter gene coding for β-galactosidase is placed in a viral context; for example a plasmid derived from pMLP-Adk7 (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991, Human Gene Transfer, 219, 51-61) comprising the Ad5 5′ sequences (nucleotides 1 to 458), the Ad2 MLP promoter, the LacZ gene, the SV40 virus polyadenylation signal and the Ad5 sequences lying between nucleotides 3329 and 6241.

The LacZ gene expression cassette surrounded by adenoviral sequences is excised by the action of the restriction enzymes *Bsr*GI (position 192 on the Ad5 genome) and *Pst*I (position 3788) and then purified. pTG3602 is linearized at the *Cla*I site (position 918) and then treated with Klenow. The two fragments obtained are cotransformed into competent BJ5183 bacteria. Recombination at the homologous adenoviral sequences brings about

the replacement of the Ad5 E1 region (nucleotides 459 to 3328) by the expression cassette for the reporter gene in the plasmid pTG3603.

Its infectious power is verified by transfection of a lawn of 293 cells transfected with pTG3603 previously digested with *Pac*I. The lytic plaques formed are then picked out and the viral particles resuspended and used to infect a monolayer of 293 cells. The blue coloration of the cells after addition of X-Gal testifies to the expression of the LacZ gene.

D. Construction of a recombinant adenoviral vector in which the exogenous gene replaces the E3 early region.

A cassette for the expression of the gene coding for the gp19 protein of the Ad5 E3 region (nucleotides 28731 to 29217) is assembled in the bacteriophage M13mp18 (Gibco BRL) by cloning two PCR fragments, one corresponding to the RSV (Rous sarcoma virus) 3' LTR (oligonucleotide primers oTG5892-SEQ ID NO: 4 and 5893-SEQ ID NO:5) and the other to the sequence coding for gp19 (oTG5455-SEQ ID NO:6 and 5456-SEQ ID NO:7). The vector M13TG1683 is obtained, from which the expression cassette is excised by an *Xba*I digestion. After treatment with Klenow, it is introduced into the *Bsm*I site (blunted by the action of phage T4 DNA polymerase) of pTG8519. The latter is derived from the plasmid puc19 [sic] (Gibco BRL), into which the adenoviral sequences lying between the *Spe*I site and the right-hand end of the genome (nucleotides 27082 to 35935) but lacking the majority of the E3 region (nucleotides 27871 to 30758) have been inserted. pTG1695 is obtained, the *Sca*I-*Spe*I fragment of which, carrying the plasmid sequences, is replaced by a purified equivalent fragment of pTG1659. The latter corresponds to puc19 [sic] comprising the Ad5 sequences extending from nucleotides 21562 to 35826. pTG1697 thereby obtained possesses adenoviral sequences which extend from the *Bam*HI (position 21562) site to the 3' ITR (position 35935), in which sequences the E3 region is replaced by a gp19 expression cassette under the control

of the RSV constitutive promoter. the *Dra*I fragment (position 22444 and 35142 on the Ad5 genome) is purified, and cointroduced into competent BJ-5183 bacteria with pTG3602 linearized with *Spe*I and treated with Klenow. The recombinants carrying a plasmid generated by recombination are screened for the presence of the RSV promoter. pTG3605, a plasmid vector carrying the Ad-gp19+ genome, is thus demonstrated.

The infectious power [lacuna] viral genome excised from plasmid pTG3605 is tested according to the protocol already described above. The production of a functional gp19 protein is monitored by co-immunoprecipitation of the antigens of the major histocompatibility complex class I and of the protein (Burgert and Kvist, 1985, Cell, *41*, 987-997).

E. Construction of a defective recombinant adenoviral vector in which both early regions E1 and E3 are replaced by exogenous genes

BJ-5183 cells are cotransformed with the *Dra*I fragment isolated from pTG1697 mentioned above, and the *Spe*I fragment (Klenow) isolated from pTG3603. The resulting plasmid is tested under the same conditions as above.

F. Construction of a recombinant adenoviral vector expressing the FIX gene

The cDNA coding for human FIX was cloned in the form of a *Bam*HI fragment into the plasmid pTG381. In the latter, the 5' non-coding end of the FIX gene was modified so as to comply with Kozak's rules. Plasmid pTG381 is described in Patent Publication FR 2,600,334. The FIX gene is recloned into the *Bam*HI site of pTG6512 to give pTG4375. pTG6512 is derived from the vector pTG6511 after deletion of the Ad2 major late promoter (MLP) and replacement by a polylinker. As a guide, the construction of pTG6511 is described in detail in Example 1 of International Application WO 94/28152. The murine PGK promoter is isolated by conventional methods from mouse genomic DNA according to Adra et al. (1987, Gene *60*, 65-74), or by means of appropriate primers created from the data of the sequence disclosed in the Genebank databank under the

reference X15339. *Pst*I restriction sites are included at the 5' ends of the primers in order to facilitate the subsequent cloning steps. The fragment carrying the PGK promoter is treated with T4 polymerase and then introduced upstream of the human FIX gene into the *Hpa*I site of pTG4375 from which a so-called "replacement" fragment, containing the FIX cassette surrounded by E1 adenoviral sequences (185 bp at the 5' end and 2045 bp at the 3' end), is excised by *Msc*I digestion.

The latter fragment is cotransformed into BJ5183 bacteria in the presence of the vector pTG3602 digested with *Cla*I (position 918). The transformants are selected on ampicillin and analyzed by restriction mapping. The clone designated pTG3614, corresponding to an adenoviral vector containing the FIX therapeutic gene in place of the E1 region (Figure 3), is selected. A viral stock is constituted in a conventional manner, by transfection of the adenoviral genome liberated by *Pac*I digestion into the 293 line. After an amplification step, the cells are lysed and the AdTG3614 viral particles purified by centrifugation on cesium chloride.

The capacity to transfer and express the FIX gene is evaluated in a mouse animal model. For this purpose, 1.5×10^9 pfu are injected into the caudal vein of 5- to 6-week-old female C57 Black 6 mice. Blood samples are drawn regularly, on which the amount of human FIX is assayed by ELISA (Diagnostica Stago Kit, Asnières, France; Asserachirom^R IX: Ag 00564). FIX is detected in the serum of mice for several weeks with a maximum at 5 days.

G. Construction of an adenoviral vector modified in the E2 region

During the normal viral cycle, the expression of the genes of the E2 region is induced by the early products of E1 and E4, and a copious production of the proteins encoded by E2, and especially of the DBP protein (for DNA binding protein), is observed. In point of fact, this high expression can be problematical *in vivo* (induction of inflammatory responses or interference with the

expression of the transgene). For this reason, adenoviral vectors defective for the E2A function were constructed, either by introduction of a temperature-sensitive mutation into E2A (position 22795; C to T resulting in a change from Pro to Ser) or by a partial deletion of the DBP gene.

The vector pTG9551 carrying the temperature-sensitive mutation is generated by homologous recombination in BJ cells between pTG3601 digested with *BglII* and the purified genomic DNA of the Ad5Hts 125 virus (Ensinger and Ginsberg, 1972, J. Virol. *10*, 328-339). The genome thus reconstituted is liberated by *Pac*I digestion and transfected into 293 cells, which are incubated at 32°C for the production of the viral particles (the non-permissive temperature is 39°C).

The defective E2A character may also be generated by partial deletion of the coding regions of the DBP gene, avoiding the regions covering other reading frames. The construction is carried out by homologous recombination between pTG3601 *Bgl*II and the viral DNA prepared from the H5dl802 virus (Rice and Klessig, 1985, J. Virol. *56*, 767-778). The viruses may be produced in a suitable complementation line transcomplementing the DBP function, for example line 293 transfected with a vector permitting the constitutive or regulated expression of the DBP gene.

H. Construction of an adenoviral vector modified in the E4 region

In a first stage, a so-called "replacement" vector is constructed, comprising a cassette for the expression of the gene coding for the CFTR protein placed within the E1 adenoviral region. This vector, designated pTG8585, contains the following elements, all described in the literature:

- the Ad5 5′ ITR (positions 1 to 458),
- the Ad2 MLP promoter,
- human CFTR cDNA,
- the polyadenylation signal of the rabbit β-globin gene,
- the RSV virus (Rous sarcoma virus) 3′ LTR,

- the adenoviral sequences coding for the gp19 protein (positions 28731 to 29217 of Ad5), and
- the 3' portion of the E1B region (position 3329 to 6241).

In parallel, the adenoviral sequences covering the E3 and E4 regions are subcloned into the vector p polyII and deleted by the standard techniques of molecular biology. The E3 sequences (positions 28592 to 30470) are removed by *Xba*I digestion and the E4 sequences (positions 32994 to 34998) are removed. The adenoviral genome thus modified is reconstituted by homologous recombination between a replacement fragment carrying these modifications, isolated from the above vector, and pTG3603 digested with *Spe*I. pTG8595 is obtained, carrying a recombinant adenoviral genome (LacZ gene in place of the E1 region) which is defective for the E3 and E4 functions.

The cassettes for the expression of the CFTR and gp19 genes, described above, are introduced into pTG8595 as a replacement for the LacZ gene, by cotransformation of BJ5183 cells with the *Pac*I-*Bst*EII fragment isolated from pTG8585 and the vector pTG8595 linearized with *Cla*I. pTG4652 (Figure 4) is generated, which may be propagated in a cell line complementing the defective E1 and E4 functions as are described in International Application WO94/28152.

The viral particles are amplified, the cells are lysed and the total cell extracts are analyzed for the expression of the CFTR gene by Western blotting (8% SDS-PAGE gel). The filters are incubated in the presence of a 1/5000 dilution of the monoclonal antibody MAB 1104 directed against a synthetic peptide corresponding to amino acids 722 to 734 of the human CFTR protein. The detection is carried out by the ECL (enhanced chemiluminescence; Amersham kit) method. A band of strong intensity and rather diffuse, corresponding to a high molecular weight product comigrating with a CFTR control, is observed in the extracts of cells infected with AdTG4652. This band is not present in the extracts

originating from the parent virus pTG8595 which does not contain the CFTR expression cassette.

EXAMPLE 2: Construction of a recombinant viral vector derived from canine adenovirus 2 (CAV2) in the form of a bacterial plasmid

A. Cloning of the CAV2 genome into p polyII

The CAV2 genome is cloned into p polyII SfiI-NotI 14 (Lathe et al., 1987, *supra*) and modified to generate recombinant vectors using the appropriate sites, according to the same methods as are used in the case of the manipulation of Ad5. The left-hand end (nucleotides 1 to 810 according to the numbering of the Genebank sequence D04368) and right-hand end (nucleotides ~ 27600 to the end) are synthesized by PCR between the oligonucleotide primer pairs oTG6974 (SEQ ID NO: 8) and oTG6975 (SEQ ID NO: 9) and oTG6976 (SEQ ID NO: 10) and oTG6974, respectively. They are assembled via the *Pst*I site introduced during the PCR following the viral sequences in the case of the left-hand end, and mapped at approximately 1200 bp from the end of the genome in the case of the right-hand end. Competent BJ5183 bacteria are cotransformed with the plasmid thereby obtained, linearized with *Pst*I, and CAV2 DNA. Introduction of the missing viral sequences (nucleotides 811 to 27600) is carried out by homologous recombination. The CAV2 genome carried by the resulting plasmid is excised via the *Not*I sites introduced during the PCR, and then transfected into a monolayer of MDCK cells (ATCC CCL34). The following steps are described in Example 1.

B. Construction of a recombinant adenoviral vector of canine origin

CAV2 virus (strain Toronto A 26/61; ATCC VR-800) genomic DNA is prepared by the standard technique (amplification on a dog kidney line MDCK GHK, etc., lysis of the cells, purification of the viruses by centrifugation on cesium chloride, treatment with proteinase k [sic] and lastly phenol/chloroform extraction). The CAV2 genome, which is 31 kbp in length, is introduced into a plasmid vector by homologous recombination. For this purpose, the

left-hand and right-hand ends of the CAV2 genome are isolated by PCR and enzymatic digestion, incorporating a *Not*I site immediately beyond the 5′ and 3′ ITRs. The vector pTG4457 is obtained by introducing into p polyII the 5′ portion of the viral genome as far as the *Bst*BI site (position 870) followed by the 3′ portion starting from the *Sal*1 site (position 27800). The complete genome may be reconstituted by cotransformation between the genomic DNA (100 to 500 ng) and pTG4457 digested with *Bst*BI (10 to 100 ng). The viral genome may be excised from the above vector pTG5406 by *Not*I digestion. It is verified that the DNA is infectious by transfection of 1 to 5 µg into dog MDCK or GHK cells. The production of plaques is observed.

The recombinant vector is obtained in the following manner:

The left-hand end of CAV2 is subcloned and modified so as to delete the E1A coding sequences in their entirety and the E1B coding sequences partially. This is performed by *Nar*I digestion, followed by reintroduction of a fragment amplified by PCR covering the encapsidation region, the E1A promoter region and the transcription startsite. The primers are designed so as to integrate a unique *Xba*I restriction site as well. pTG5407 is obtained, into which the CAT gene or LacZ gene (pTG5408) is introduced at the *Xba*I site. The latter plasmid is digested with *Xho*I, and the 3′ portion of the viral genome is inserted in the form of a *Sal*I fragment (position 27800 to the end of the 3′ ITR). The vector pTG5409 thereby obtained is linearized with *Sal*I and cotransformed into *E. coli* BJ5183 with the CAV-2 genome digested with *Swa*I. An adenoviral vector of canine origin carrying the CAT reporter gene in place of the E1 region is obtained.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:
(A) NAME: Transgene S.A.
(B) STREET: 11 rue de Molsheim
(C) CITY: Strasbourg
(E) COUNTRY: France
(F) POSTAL CODE: 67082
(G) TELEPHONE: (33) 88 27 91 00
(H) TELEFAX: (33) 88 22 58 07

(ii) TITLE OF INVENTION: New method for the preparation of a viral vector

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 10

(iv) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Tape
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 38 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: human adenovirus
(B) STRAIN: serotype 5
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG6597

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

GCCGAATTCT TAATTAACAT CATCAATAAT ATACCTTA 38

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 35 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: human adenovirus
(B) STRAIN: serotype 5
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG6598

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

GACAGATCTG TCGACGTGGC AGGTAAGATC GATCA 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 35 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: human adenovirus
(B) STRAIN: serotype 5
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG6599

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 3:

AGGAGATCTG TCGACTCTCA AACATGTCTG CGGGT 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 47 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Rous sarcoma virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG5892

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 4:

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTG TGTTGGAGGT CGCTGAG 47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 47 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: Rous sarcoma virus
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG5893

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 5:

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT GGTGAATGGT CAAATGG 47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: human adenovirus
(B) STRAIN: serotype 5
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG5455

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 6:

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC 25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 28 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: human adenovirus
(B) STRAIN: serotype 5
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG5456

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 7:

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC 28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 36 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: canine adenovirus
(B) STRAIN: CAV-2
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG6974

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 8:

CAGGGATCCG CGGCCGCATC ATCAATAATA TACAGG 36

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 29 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: YES

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: canine adenovirus
(B) STRAIN: CAV-2
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG6975

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 9:

CTGCTGCAGT CAGAAATGCT AGCAGGAGA 29

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iii) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: canine adenovirus
(B) STRAIN: CAV-2
(C) INDIVIDUAL ISOLATE: synthetic oligonucleotide OTG6976

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 10:

TGCGGATCCA CAGACTAAGC GGAGGTA 27

Claims

1. Method for preparing, in a prokaryotic cell, a recombinant viral vector derived from a parent virus into the genome of which an exogenous DNA sequence is inserted, by intermolecular recombination between (i) a first DNA fragment comprising all or part of said genome of the parent virus and (ii) a second DNA fragment comprising said exogenous DNA sequence surrounded by flanking sequences A and B which are homologous to (i).

2. Method according to claim 1, characterized in that the parent virus is selected from the group consisting of adenoviruses, retroviruses, adeno-associated viruses, poxviruses and herpesviruses.

3. Method according to claim 2, characterized in that the parent virus is an adenovirus of human, canine, avian, bovine, murine, ovine, porcine or simian origin, or alternatively a hybrid adenovirus.

4. Method according to claim 3, characterized in that the parent virus is a type CAV-2 adenovirus of canine origin.

5. Method according to claim 3, characterized in that the parent virus is a serotype C adenovirus of human origin.

6. Method according to claim 5, characterized in that the parent virus is a type 5 adenovirus of human origin.

7. Method according to one of claims 1 to 6, characterized in that said exogenous DNA sequence codes for a polypeptide of therapeutic interest selected from the group consisting of coagulation factors, growth hormones, cytokines, lymphokines, tumor-suppressing polypeptides, cell receptors, ligands for cell receptors, protease inhibitors, antibodies, toxins, immunotoxins, dystrophin and polypeptides participating in cellular ion channels, such as CFTR protein.

8. Method according to one of claims 1 to 7, characterized in that the homologous flanking sequences A and B are from 10 bp to 10 kb, advantageously from 20 bp to

5 kb, preferably from 30 bp to 2 kb, and as an absolute preference from 40 bp to 1 kb, in length.

9. Method according to one of claims 1 to 8, characterized in that the first DNA fragment is linearized in the insertion region of the exogenous sequence.

10. Method according to one of claims 1 to 9, for the preparation of a recombinant viral vector which is defective for replication.

11. Method according to claim 10, for the preparation of a recombinant adenoviral vector lacking all or part of at least one region essential for replication, selected from the E1, E2 and E4 regions.

12. Method according to claim 11, characterized in that the recombinant adenoviral vector lacks, in addition, all or part of the E3 region.

13. Method according to one of claims 1 to 12, for the preparation of a recombinant viral vector of at least 20 kb.

14. Method according to claim 13, for the preparation of a recombinant viral vector of at least 30 kb.

15. Method according to claims 1 to 14, by intermolecular recombination between (i) a first DNA fragment comprising all or part of said genome of the parent virus, (ii) a second DNA fragment comprising a first portion of said DNA sequence of interest equipped at its 5′ end with said flanking sequences [sic] A and (iii) a third DNA fragment comprising a second portion of said DNA sequence of interest equipped at its 3′ end with said flanking sequences [sic] B; said second and third DNA fragments containing a homologous sequence at their respective 3′ and 5′ ends.

16. Method according to one of claims 1 to 15, for introducing a modification by deletion, mutation and/or substitution of one or more nucleotides or an exogenous DNA sequence into a viral genome.

17. Method according to one of claims 1 to 16, characterized in that said prokaryotic cell is derived from a recBC sbcBC strain of Escherichia coli.

18. Method for preparing an infectious viral particle

containing a recombinant viral vector obtained by carrying out a method according to one of claims 1 to 17, according to which:

(a) said recombinant viral vector is introduced into a mammalian cell to generate a transfected mammalian cell,

(b) said transfected mammalian cell is cultured under suitable conditions to permit the production of said viral particle, and

(c) said viral particle is recovered from the cell culture obtained in step (b).

19. Use of an infectious viral particle prepared according to claim 18 or of a recombinant viral vector prepared according to one of claims 1 to 17, for the therapeutic or surgical treatment of the human body.

20. Use according to claim 19, for the therapeutic or surgical treatment of the human body by gene therapy.

21. Pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an infectious viral particle prepared according to claim 18 or of a viral vector prepared according to one of claims 1 to 17, in combination with a vehicle which is acceptable from a pharmaceutical standpoint.

22. Use of an infectious viral particle prepared according to claim 18 or of a recombinant viral vector prepared according to one of claims 1 to 17, for the expression of a DNA sequence of interest in a cell system.

23. Use of a recBC sbcBC strain of *E. coli* for the cloning of DNA fragments into a plasmid vector by intermolecular homologous recombination.

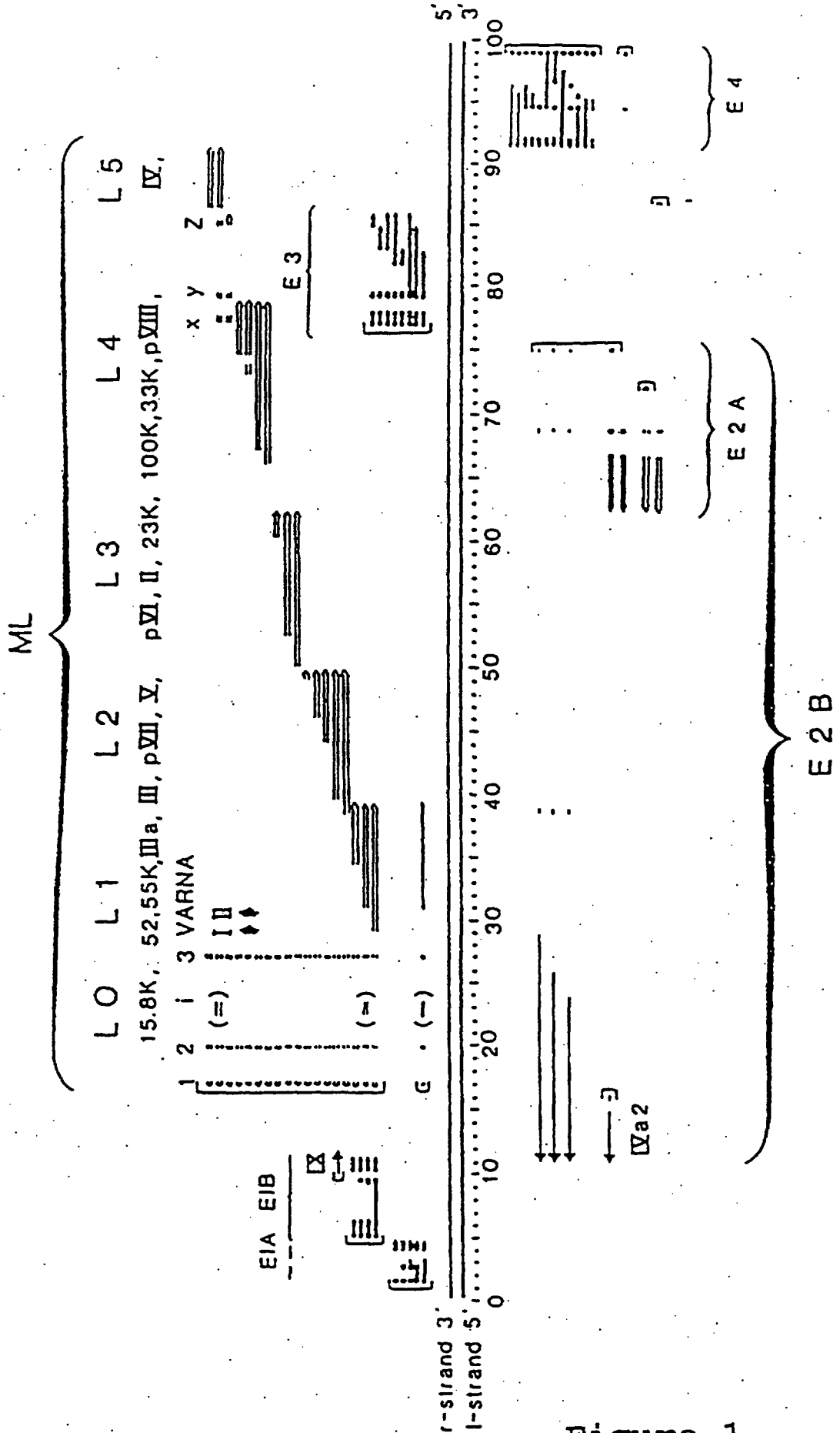

ML
L0 L1 L2 L3 L4 L5
15.8K, 52,55K, IIIa, III, pVII, V, pVI, II, 23K, 100K, 33K, pVIII, IV,
1 2 3 VARNA
I II
x y z
E3
E4
E2A
E2B
EIA EIB
IVa2
r-strand 3'
l-strand 5'
5' 3'
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

Figure 1

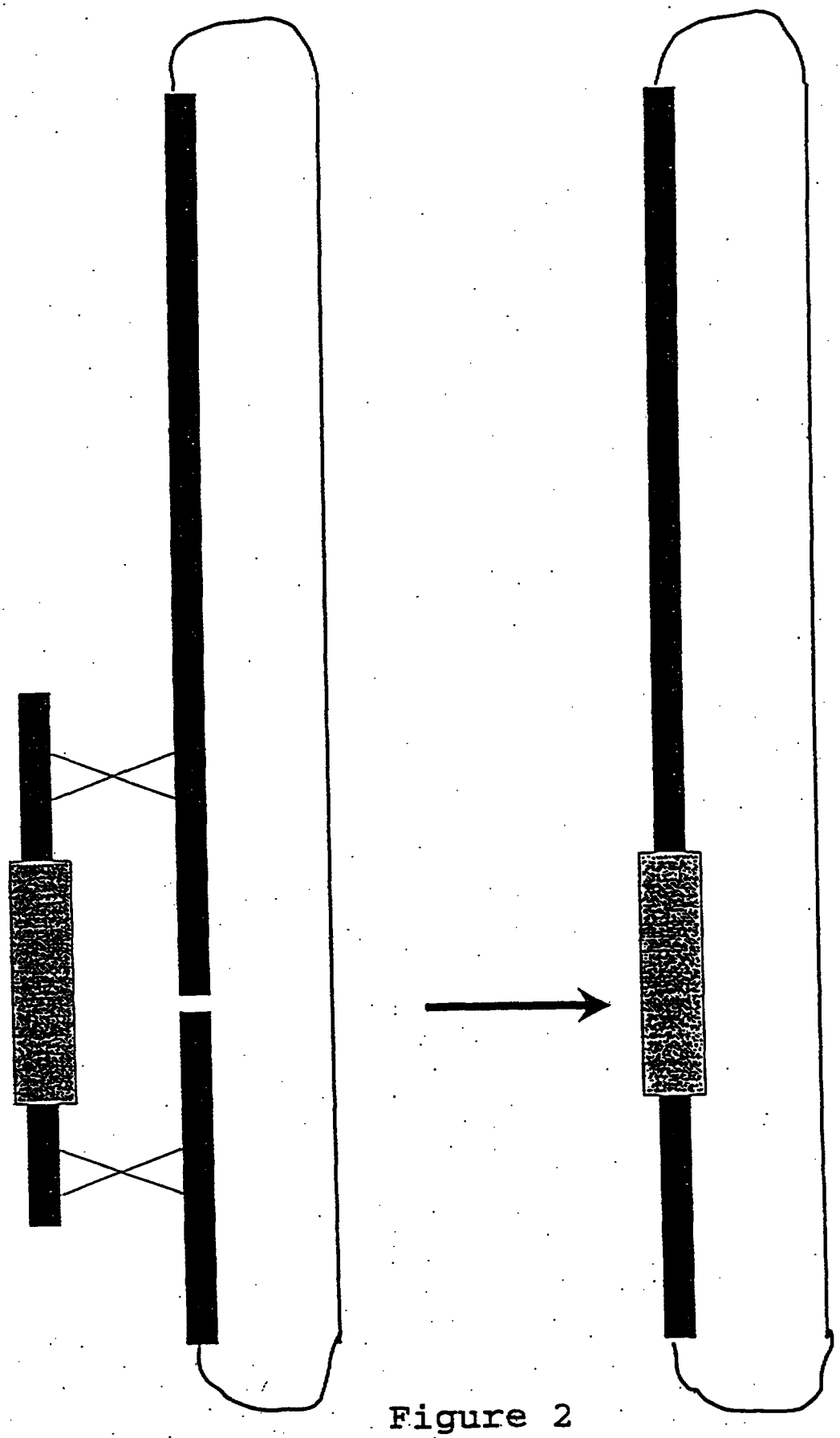


Figure 2

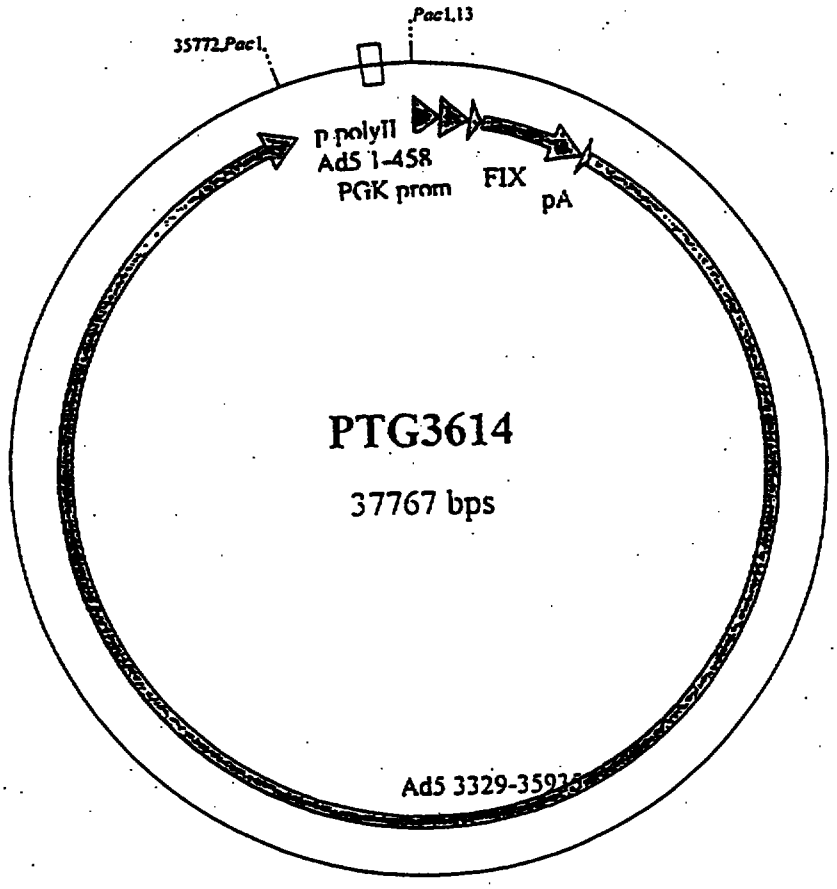

35772_Pac1
Pac1.13
p polyII
Ad5 1-458
PGK prom
FIX
pA
PTG3614
37767 bps
Ad5 3329-35935

Figure 3

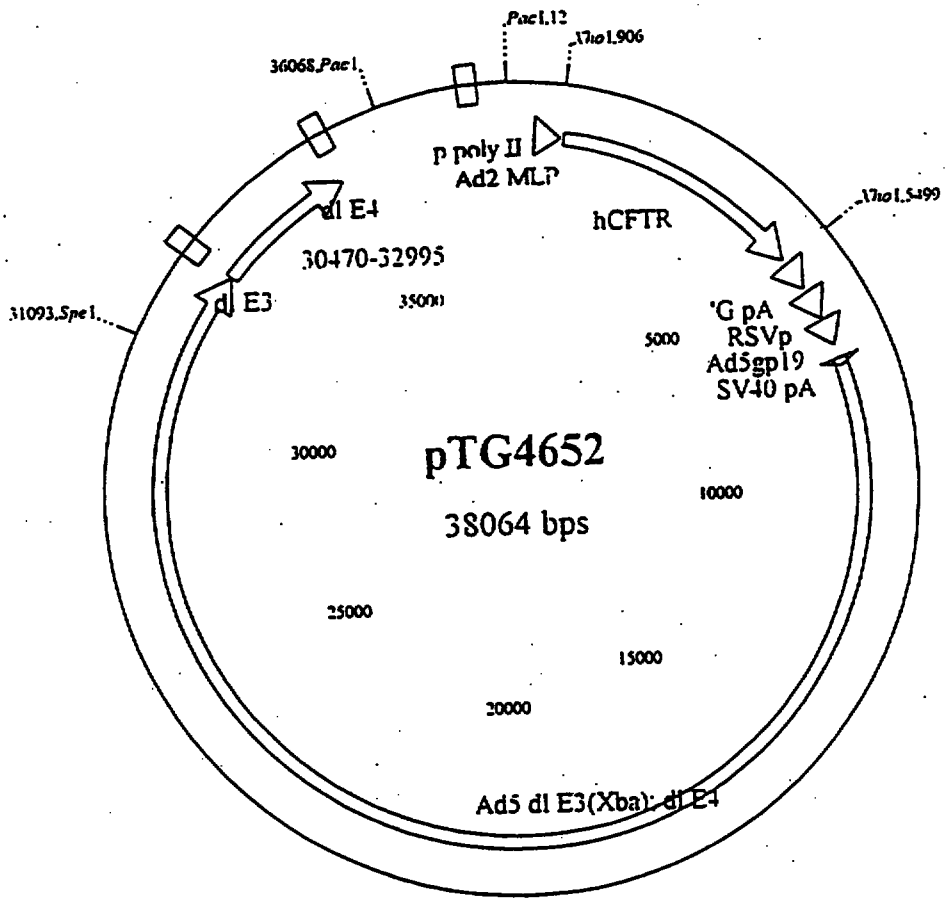

Pac1.12
Xho1.906
36068,Pac1
p poly II
Ad2 MLP
dl E4
30470-32995
hCFTR
Xho1.5499
31093,Spe1
dl E3
35000
5000
'G pA
RSVp
Ad5gp19
SV40 pA
30000
pTG4652
10000
38064 bps
25000
15000
20000
Ad5 dl E3(Xba); dl E4

Figure 4