



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 523**

51 Int. Cl.:
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05815456 .8**
96 Fecha de presentación : **12.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1799836**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **Vectores adenovirales mejorados y usos de los mismos.**

30 Prioridad: **13.10.2004 EP 04105005**
13.10.2004 US 618469 P
08.07.2005 US 697724 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.05.2011

73 Titular/es: **CRUCCELL HOLLAND B.V.**
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL
Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.

72 Inventor/es: **Havenga, Menzo Jans Emco y**
Barouch, Dan

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

DESCRIPCIÓN

Vectores adenovirales mejorados y usos de los mismos.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere al campo de la medicina, más en particular al campo del tratamiento terapéutico y profiláctico, usando vectores adenovirales quiméricos recombinantes que comprenden un ácido nucleico terapéutico en composiciones de vacuna.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Se aplican ampliamente vectores adenovirales recombinantes para aplicaciones de terapia génica y vacunas. Hasta la fecha, se han identificado 51 serotipos de adenovirus diferentes. Se han estudiado de la forma más extensa los adenovirus del subgrupo C para aplicaciones tales como terapia génica; especialmente se usan ampliamente el serotipo 2 y 5 (Ad2 y Ad5) en la técnica. Se usa Ad5 recombinante en una variedad de fines diferentes, incluyendo vacunación. De manera importante, se ha mostrado que las vacunas a base del vector Ad5 provocan respuestas inmunitarias protectoras y potentes en una variedad de modelos animales. Además, están en marcha ensayos clínicos a gran escala para vacunación contra VIH en los que están usándose vectores recombinantes basados en Ad5 (documento WO 01/02607; documento WO 02/22080; Shiver *et al.* 2002; Letvin *et al.* 2002; Shiver y Emini. 2004). Sin embargo, la utilidad de las vacunas basadas en el vector Ad5 recombinante para VIH y otros patógenos probablemente estará significativamente limitada por la alta seroprevalencia de anticuerpos neutralizantes (Acn) específicos de Ad5 en poblaciones humanas. Se ha mostrado que la existencia de inmunidad anti-Ad5 suprime sustancialmente la inmunogenicidad de vacunas basadas en Ad5 en estudios en ratones y monos rhesus. Datos tempranos de ensayos clínicos en fase 1 muestran que este problema también puede producirse en seres humanos (Shiver 2004).

- 25 Una estrategia prometedora para burlar la existencia de una inmunidad preexistente en individuos previamente infectados con los adenovirus humanos más comunes (tales como Ad5) implica el desarrollo de vectores recombinantes a partir de serotipos de adenovirus que no encuentran tales inmunidades preexistentes. Los vectores adenovirales humanos que se identificó que eran particularmente útiles se basan en los serotipos 11, 26, 34, 35, 48, 49 y 50 tal como se mostró en los documentos WO 00/70071, WO 02/40665 y WO 2004/037294 (véase también Vogels *et al.* 2003). Otros han encontrado que también el adenovirus 24 (Ad24) es de particular interés ya que se muestra que es un serotipo raro (documento WO 2004/083418).

- 30 Una estrategia similar se basa en el uso de adenovirus de simio ya que estos normalmente no infectan a seres humanos. Muestran una baja seroprevalencia en muestras humanas. Sin embargo, pueden aplicarse para uso humano ya que se mostró que estos virus podían infectar células humanas *in vitro* (documento WO 03/000283; documento WO 2004/037189).

- 35 Se mostró que las vacunas basadas en el vector de serotipo de adenovirus 35 (Ad35) podían provocar respuestas inmunitarias celulares potentes que no se suprimían significativamente por una inmunidad anti-Ad5 (Barouch *et al.* 2004; Vogels *et al.* 2003). De manera similar, se ha mostrado que los adenovirus de chimpancé provocan respuestas inmunitarias que se vieron mínimamente afectadas por una inmunidad anti-Ad5 (Farina *et al.* 2001; Pinto *et al.* 2003). Recientemente, se ha demostrado que las respuestas de linfocitos T CD8⁺ y anticuerpos neutralizantes (Acn) contribuyen ambos a la inmunidad anti-Ad5, mientras que los Acn específicos de Ad5 parecen desempeñar un papel primario (Sumida *et al.* 2004). Aunque este desarrollo parece ser un enfoque muy útil, también se ha demostrado en ratones que las vacunas basadas en el vector de Ad35 probaron ser menos inmunogénicas que las vacunas basadas en el vector de Ad5 en estudios en los que no había inmunidad frente a Ad5 preexistente (Barouch *et al.* 2004).

- 45 Evidentemente, existe una necesidad en el campo de vectores adenovirales alternativos que no encuentren inmunidades preexistentes en el huésped, pero que todavía sean inmunogénicos y capaces de inducir respuestas inmunes fuertes contra las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos heterólogos insertados en el ácido nucleico portado por el vector.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 50 La figura 1 muestra la inmunogenicidad de vectores Ad5-Gag, Ad5HVR48(1)-Gag y Ad5HVR48(1-7) en ratones sin tratamiento previo que reciben (A) 10⁹ pv, (B) 10⁸ pv o (C) 10⁷ pv. Se evaluaron las respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicos de Gag mediante ensayos de unión a tetrámero D^b/AL11 a múltiples puntos de tiempo tras la inmunización.

La figura 2 muestra la inmunogenicidad de vectores Ad5-Gag, Ad5HVR48(1)-Gag y Ad5HVR48(1-7) en ratones que reciben (A) 10⁹ pv, (B) 10⁸ pv o (C) 10⁷ pv, preinmunizados con dos inyecciones de 10¹⁰ pv de Ad5-Vacío entre 8 y 4 semanas antes de la inmunización.

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:12) de la proteína hexón basada en Ad5, con la incorporación de las siete HVR para las siete HVR correspondientes (subrayadas) de Ad48 (Ad5HVR48(1-7)).

La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:16) de la proteína hexón basada en Ad5, con la incorporación de las siete HVR para las siete HVR correspondientes (subrayadas) del adenovirus Pan9 (Ad5HVRPan9(1-7)).

La figura 5 es un gráfico que indica la respuesta de linfocitos T CD8+ en ratones tras una preinmunización doble con Ad5-vacío, seguido por una sensibilización en el día 0 con Ad35-Gag y un refuerzo en el día 28 con tres vectores diferentes tal como se indica.

SUMARIO DE LA INVENCION

En este documento se dan a conocer vectores adenovirales recombinantes recién desarrollados para una administración génica, vacunación y terapia génica mejoradas.

El virus producido según la invención es un adenovirus recombinante basado en un adenovirus del subgrupo C, Ad5, que se hace que sea de replicación defectuosa mediante una delección funcional de la región E1 y en el que la proteína hexón en la cápsida viral es una proteína quimérica tal que se han sustituido las regiones hipervariables (HVR) por las HVR derivadas de un serotipo de adenovirus raro. Tales serotipos raros no encuentran Acn en la mayoría de los individuos en la población humana. Un serotipo preferido que se usa para proporcionar las HVR es Ad48. Preferiblemente, el virus recombinante comprende un ácido nucleico heterólogo de interés que va a administrarse al huésped para fines profilácticos o terapéuticos.

DESCRIPCION DETALLADA

Tal como se comentó anteriormente, el uso de vectores recombinantes basados en Ad5 se ha visto dificultado por la existencia de anticuerpos neutralizantes (Acn) que están presentes en la mayoría de los individuos humanos debido a una infección anterior con un virus de tipo natural. Aunque las diferentes proteínas de la cápsida presentes en la envuelta viral inducen anticuerpos en el huésped, se ha demostrado que la diana primaria de Acn específicos de Ad5 es la proteína hexón de Ad5 (Sumida *et al.* 2005). Esto condujo a la idea de que, cambiando la proteína hexón de manera que ya no pueda ser detectada por los Acn preexistentes, podrían producirse vectores adenovirales mejorados que serían beneficiosos en seres humanos que o bien todavía tienen Acn contra Ad5, o que se inmunizaron anteriormente con vacunas previas basadas en Ad5, o bien que se inmunizaron con vectores basados en Ad5 en un régimen de vacunación de sensibilización/refuerzo. Sin embargo, alterar la proteína hexón no resultó ser una tarea fácil. Generalmente, sólo han sido posibles cambios de hexones completos entre adenovirus dentro del mismo subgrupo de Ad o daban como resultado un virus escasamente viable (Youil *et al.* 2002; Gall *et al.* 1998; Roy *et al.* 1998). Si esta fuera la limitación, entonces un vector basado en Ad5 tenía que contener una proteína hexón de otros adenovirus del subgrupo C. Sin embargo, la mayoría de estos, si no todos, son inútiles en el sentido de que esos serotipos no se consideran raros. La mayoría de los individuos en la población humana se ha encontrado una vez con los serotipos del subgrupo C. Sería preferible usar un hexón de un serotipo que no deba encontrar Acn ya presentes. Esos serotipos raros se encuentran predominantemente en el subgrupo B (Ad11, Ad34, Ad35, Ad50) y D (Ad24, Ad26, Ad48 y Ad49).

Los inventores de la presente invención han mostrado por primera vez que (re)definiendo partes específicas del hexón y usando un enfoque conservador y datos de estructura y secuencia disponibles, podrían identificarse ciertas regiones y podrían cambiarse dando como resultado virus recombinantes producibles que son viables y podrían producirse en títulos suficientemente altos. Los serotipos preferidos que se usan para proporcionar su proteína hexón o las partes relevantes de la misma son Ad11, Ad24, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 y Ad50, ya que se sabe que estos serotipos encuentran una baja inmunidad preexistente (véase el documento WO 00/70071). Ad48 es el serotipo más preferido. También son interesantes adenovirus no humanos en este sentido. Un ejemplo preferido es el adenovirus de chimpancé Pan9.

Las regiones que se identificaron son los 7 bucles de superficie también conocidos como las regiones hipervariables del hexón (HVR). La variabilidad del hexón entre serotipos de adenovirus se concentra en estos 7 bucles (Crawford-Miksza y Schnurr. 1996). Debe entenderse que la invención no se limita al uso de las HVR de Ad48 tal como se explica resumidamente en los ejemplos. Los inventores identificaron HVR en Ad5 y Ad48 en una definición un tanto amplia (véase la Tabla II). Ad48 sirve como ejemplo para todos los otros serotipos que también encuentran una baja inmunidad preexistente y que también son útiles en la preparación de adenovirus quiméricos que se benefician de las ventajas conocidas de los adenovirus del subgrupo C, mostradas a modo de ejemplo por Ad5 (fuerte inmunogenicidad, facilidad de producción, etc.) con los beneficios de los serotipos raros (baja inmunidad preexistente). Evidentemente, si se contemplase el uso de un régimen de vacunación de sensibilización/refuerzo en el que se prefiere usar otra estructura principal de serotipo, tal como Ad35, entonces sería beneficioso reforzar con un vector que no se encuentre con los Acn generados contra el vector de sensibilización. Ejemplos no limitativos de tales vectores son Ad5HVR48, que tienen siete HVR intercambiadas entre serotipos. De ese modo, se toman las siete HVR de un serotipo raro y se insertan en el hexón del serotipo de estructura principal. Los inventores de la presente invención mostraron que la sustitución de las siete HVR de Ad5 por las HVR correspondientes de Ad48

daba como resultado un vector viable y producible que casi no se encontraba con ninguna inmunidad preexistente en ratones inmunizados con virus Ad5 vacíos. Sin embargo, si sólo se sustituyese la primera HVR (observado desde la ITR izquierda hasta la ITR derecha en el genoma viral) no se vería ningún efecto. Además, los vectores que contienen hexones quiméricos pueden demostrar ser beneficiosos en entornos en los que existe sólo una actividad moderada de Acn en el huésped. La inmunidad preexistente generada según los ejemplos proporcionados es muy alta debido a 2 dosis consecutivas de 10^{10} pv del vector de Ad5 vacío. No obstante, lo más preferido es que se sustituyan todas las HVR dentro de la proteína hexón ya que esto proporcionaría la mejor oportunidad de producir un vector no detectado por los Acn preexistentes presentes en el huésped.

Un ácido nucleico terapéutico se define como un ácido nucleico que codifica para una sustancia proteica terapéutica, tal como una proteína, un péptido o un polipéptido, que es útil en el tratamiento de diagnóstico, terapéutico y/o profiláctico de mamíferos, preferiblemente seres humanos. Ejemplos de proteínas terapéuticas son proteínas que provocan respuestas inmunitarias en vacunación contra tumores. Otros ejemplos son proteínas que son útiles en la terapia de trastornos genéticos, tales como las usadas en terapia génica. Proteínas terapéuticas preferidas son proteínas derivadas o basadas en o clonadas (directamente) de bacterias, parásitos o entidades infecciosas tales como virus. Los vectores adenovirales son altamente aplicables para fines de vacunación contra virus tales el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), VIS, virus Ébola, virus de la rabia, virus del herpes simple (VHS), virus de la hepatitis C (VHC), etc. Ejemplos de antígenos derivados de VIH que pueden codificarse en el ácido nucleico adenoviral son nef, gag, pol y env. Un ejemplo de un antígeno de VHS es el antígeno 9D. También pueden usarse proteínas terapéuticas de parásitos tales como los que provocan malaria en los vectores de la presente invención. Proteínas particularmente preferidas que pueden clonarse en estos vectores son las de *Plasmodium falciparum*, tales como la proteína circumsporozoito (CSP) y LSA-1. Otras proteínas preferidas pueden ser las de cepas de *Mycobacterium*, particularmente las que provocan tuberculosis, tales como *Mycobacterium tuberculosis*. Antígenos preferidos de esta bacteria son los antígenos 10.4, 85A, 85B y 85C, que pueden usarse por tanto en los vectores de la presente invención. Las proteínas usadas como marcadores para estudios *in vitro* no se contemplan normalmente como proteínas terapéuticas, de modo que GFP, luciferasa o CAT no se consideran terapéuticas.

Se conocen bien en la técnica promotores y secuencias de poli(A) adecuados que pueden usarse para expresar los antígenos e incluyen, pero no se limitan a CMV, Ad2 MLP, SV40, etc. Por ejemplo, pueden derivarse secuencias de terminación de la transcripción adecuadas de SV40 o BGH. Las secuencias codificantes de los antígenos pueden tener codones optimizados para una expresión óptima en mamíferos, preferiblemente seres humanos. Los métodos para la optimización de codones se conocen bien en la técnica.

Una proteína terapéutica de interés tal como se usa en el presente documento se refiere a proteínas que son útiles en el tratamiento terapéutico de mamíferos, tal como una terapia génica. Una proteína antigénica de interés tal como se usa en el presente documento se refiere a una proteína de interés hacia la cual se provoca una respuesta inmunitaria tras la expresión en el huésped, o en las células huésped. Se requiere esta respuesta inmunitaria para diferentes tipos de entornos de vacunación: un ejemplo es la vacuna contra tumores en la que la respuesta inmunitaria hacia la proteína antigénica de interés se añade a la eliminación de células tumorales que expresan la proteína, mientras que otra aplicación preferida es en tratamiento profiláctico tal como vacunación para prevenir o inhibir significativamente la infección del huésped por patógenos, tales como virus, bacterias, hongos o parásitos. Por tanto, preferiblemente, dicha proteína antigénica de interés comprende una proteína de un virus, una bacteria, un parásito o un hongo. También pueden usarse los adenovirus recombinantes según la invención para provocar respuestas inmunitarias hacia las proteínas antigénicas de interés en el transcurso de un tratamiento de una infección que ya se ha producido, por tanto para prevenir la replicación, el empaquetamiento, etc. En otras palabras, también pueden usarse los vectores para prevenir la propagación del virus desde el huésped ya infectado al siguiente.

En una realización, el adenovirus recombinante según la invención comprende un ácido nucleico heterólogo, que está bajo el control de un promotor heterólogo.

En un aspecto preferido de la invención, dicha proteína antigénica comprende una proteína de un virus, en el que dicho virus es un retrovirus, VHS o un virus Ébola, mientras que se prefiere que si la proteína antigénica es de un retrovirus, dicho virus sea un retrovirus de la inmunodeficiencia humana o de simios, en el que dicho ácido nucleico heterólogo comprende preferiblemente uno o más genes seleccionados de los genes que codifican para el grupo de proteínas del virus de la inmunodeficiencia que consiste en: gag, pol, env y nef.

En otro aspecto de la invención, dicha proteína antigénica de interés proviene de un parásito que provoca malaria, en el que dicha proteína es preferiblemente una proteína circumsporozoito, o un antígeno específico del hígado (LSA-1, LSA-3), o una parte inmunogénica de la misma, de una especie de *Plasmodium*, más preferiblemente *Plasmodium falciparum*.

Cambios del HVR de hexón

Puesto que los Acn específicos de Ad5 dominantes se dirigen principalmente contra la proteína hexón de Ad5, se pensó que los vectores de Ad5 recombinantes novedosos que contienen cambios mutacionales dirigidos en

el hexón pueden ser capaces de evadir los Acn específicos de hexón de Ad5 dominantes. Este concepto no es nuevo y se han realizado varios intentos en la técnica para producir tales vectores adenovirales "invisibles". Sin embargo, ninguno de ellos demostró tener éxito, tal como se explica resumidamente a continuación.

Más del 99% de la variabilidad de aminoácidos entre las proteínas hexón de diferentes serotipos parece concentrarse en siete regiones hipervariables (HVR) relativamente cortas que se ubican en la superficie expuesta del hexón como se identificó por Crawford-Miksza y Schnurr (1996). Estos autores compararon las proteínas hexón de 15 adenovirus diferentes (Ad1, Ad2, Ad5, Ad6, Ad8, Ad9, Ad12, Ad15, Ad16, Ad31, Ad40, Ad41, Ad48, BAV3 y MAV1). Se identificaron las siete HVR entre los 250 residuos variables en los bucles 1 y 2 (también denominados 11 y 12), estando HVR1-HVR6 en el bucle 1 y HVR7 en el bucle 2. Crystal y colaboradores (véase el documento WO 98/40509; documento US 6.127.525; documento US 6.153.435) sustituyeron todo el bucle 1 y 2 del vector de estructura principal (Ad5) por los bucles 1 y 2 de Ad2 (Gall *et al.* 1998) basándose en los hallazgos de Crawford-Miksza *et al.* (1996). También se preparó un vector en el que sólo se sustituyó el bucle 2. Se produjeron virus viables. Ad2 y Ad5 son ambos adenovirus del subgrupo C y aún estaba presente neutralización cruzada, incluso tras la sustitución de ambos bucles, lo que indica que tales cambios no darían como resultado vectores que tendrían una capacidad disminuida o una incapacidad para ser reconocidos por un anticuerpo neutralizante dirigido contra la proteína hexón del adenovirus de tipo natural, al menos no cuando los cambios están dentro del mismo subgrupo. Además de tratar de obtener tales vectores, también se intentó intercambiar los bucles de Ad5 y sustituirlos por los bucles de Ad7. Estos intentos fallaron, no se produjo ningún virus viable, lo que indica que cambios de un subgrupo a otro eran imposibles de realizar, al menos basándose en la identificación de las HVR por Crawford-Miksza. Por supuesto, con el conocimiento de la estructura genómica viral al alcance de la mano, puede lograrse la modificación genética necesaria mediante técnicas de biología molecular generales, dando como resultado plásmidos/cósmidos que deben codificar para todo el virus (quimérico) recombinante. Sin embargo, por motivos desconocidos, pero lo más probablemente debido a los aspectos bastante críticos de la estructura compleja del hexón y su papel en la formación de la cápsida, no se obtuvieron virus viables cuando se modificó la región que codificaba para el hexón (Rux *et al.* 2003). Gall *et al.* (1998) sugirieron intercambiar sólo los bucles externos en lugar de intercambiar todo el hexón. También se mencionó que las otras proteínas de la cápsida, tales como el pentón, pueden tener epítomos de neutralización significativos que expliquen el fallo con los cambios de Ad5-Ad2.

Los inventores de la presente invención también trataron de generar adenovirus quiméricos basados en Ad5 que portaban proteínas hexón quiméricas que comprendían las HVR de Ad35 o Ad48 en lugar de las HVR de Ad5, tal como se indica por Crawford-Miksza y Schnurr (1996) y tal como se explica resumidamente además por Rux y Burnett (2000). Estos intentos fallaron. Esto sucedió conjuntamente con los descubrimientos de Crystal *et al.* que tampoco pudieron mostrar ninguna producción de virus recombinantes, en los que se intercambiaron las partes del hexón de diferentes subgrupos (véase anteriormente).

Para abordar este tema, Rux *et al.* (2003) mostraron nuevos refinamientos cristalográficos de alta resolución que se hicieron de las estructuras de hexón de Ad2 y de Ad5 para resolver las diferencias encontradas anteriormente en las estructuras de hexón de Ad2 y Ad5. Esto dio como resultado una nueva definición de las regiones dentro de la proteína hexón, indicando nueve HVR en vez de siete. Rux *et al.* (2003) también identificaron partes de la proteína hexón que no deben violarse cuando se diseñan vectores basados en adenovirus novedosos.

Los inventores de la presente invención también intentaron producir adenovirus quiméricos que comprendían proteínas hexón quiméricas con HVR cambiadas, basándose en las definiciones proporcionadas por Rux *et al.* (2003). Sin embargo, de nuevo, no se produjo ningún virus viable. Evidentemente, basándose en las definiciones proporcionadas en la técnica referentes a las HVR del hexón, no podían producirse adenovirus recombinantes que tenía una o más de las HVR intercambiadas entre un vector de estructura principal y otro serotipo, al menos entre serotipos de adenovirus de diferentes subgrupos.

Los inventores de la presente invención han identificado ahora siete HVR dentro de adenovirus humanos que difieren de las siete HVR identificadas por Crawford-Miksza y Schnurr (1996) y que también difieren de las nueve HVR identificadas por Rux *et al.* (2003). La definición según la invención se indica en la tabla II. La sustitución de estas HVR solas dio como resultado la producción de un virus viable. Por lo que conocen los inventores, ésta es la primera vez que alguien ha podido generar adenovirus quiméricos que comprenden proteínas hexón quiméricas, en las que no se intercambian todos los bucles, sino en las que se intercambian las distintas HVR. También se sostiene que éste es el primer intento exitoso de obtener adenovirus recombinantes que comprenden proteínas hexón quiméricas, en los que los hexones comprenden partes de serotipos de adenovirus de dos subgrupos diferentes. La base conceptual para la redefinición de las HVR fue usar aminoácidos conservados como puntos de unión. Sin embargo, las definiciones proporcionadas anteriormente en la técnica no fueron suficientes para proporcionar vectores viables con hexones quiméricos. Preferiblemente, las secuencias de las HVR identificadas (tal como se representan por SEQ ID NO:17-23, 24-30 y 52-58) son las regiones que se cambian entre serotipos.

Se construyeron vectores basados en Ad5 que contenían una o más HVR intercambiadas de Ad35 (subgrupo B) o Ad48 (subgrupo D) tal como se da a conocer en los ejemplos. Evidentemente, pueden intercambiarse una o más HVR. Ya que es probable que se dirijan Acn a cualquiera de las HVR, se prefiere que la mayoría, si no todas las HVR, sean de un serotipo raro en lugar de las HVR de tipo natural del vector de estructura principal. Por otro lado, tales cambios grandes podrían dar como resultado vectores viables más difíciles de producir.

En el presente documento, se da a conocer ahora que las siete HVR identificadas dentro del vector de estructura principal (mostrado a modo de ejemplo por Ad5) pueden sustituirse por las siete HVR correspondientes de un serotipo raro (mostrado a modo de ejemplo por Ad48).

Las regiones espaciadoras entre las HVR siguen siendo parte preferiblemente del serotipo de estructura principal para garantizar el plegado apropiado de la proteína. La estructura principal preferida es Ad5, aunque pueden usarse también otros serotipos generalmente usados y ampliamente aplicados del subgrupo C, tales como Ad2. Cuando se cambian las HVR, lo más preferiblemente se cambian las siete HVR.

Los vectores Ad5HVR35 y Ad5HVR48 que se generaron tal como se da a conocer en el presente documento son substancialmente más inmunogénicos que los vectores de Ad5 recombinantes en presencia de inmunidad anti-Ad5, debido a que los Acn, que se dirigen principalmente contra la proteína hexón de Ad5 en individuos infectados por Ad5, ya no pueden neutralizarse a través de las HVR del hexón de Ad35 y Ad48. Esta característica se cumple para todas las HVR tomadas de todos los serotipos raros conocidos.

Tal como se muestra más adelante, los virus Ad5HVR48(1-7), que contienen las siete HVR de Ad48 en lugar de las siete HVR de Ad5, dan como resultado un virus que no se ve dificultado por una inmunidad preexistente inducida por una inyección previa con el virus Ad5. Esto permite ahora usar vectores basados en Ad5 en numerosos entornos, por ejemplo en regímenes de sensibilización-refuerzo en los que se requiere que el reconocimiento de receptores entre el vector de sensibilización y el vector de refuerzo siga siendo el mismo. Otra aplicación sería la aplicación terapéutica o vacunación con un vector basado en Ad5 en individuos que se han encontrado con una infección por Ad5 de tipo natural previamente al tratamiento.

Basándose en la identificación de las HVR tal como se da a conocer en el presente documento, ahora son factibles numerosas combinaciones entre vectores de estructura principal y otros serotipos de adenovirus. El conocimiento puede extrapolarse a los hexones de todos los adenovirus humanos y no humanos conocidos. Siempre que se requiera un régimen de sensibilización-refuerzo (no sólo para entornos en los que se requieren vectores basados en Ad5), puede aplicarse el conocimiento proporcionado en el presente documento para construir un vector con capacidad de invisibilidad, concretamente evitar la inmunidad preexistente contra las HVR del hexón presentes en el virus aplicado anterior. Se entiende que los vectores quiméricos de las HVR tal como se dan a conocer en el presente documento pueden modificarse adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede alterarse la fibra para producir una capacidad de direccionamiento específica (por ejemplo, pueden dirigirse fibras knob de virus del subgrupo B, ubicadas en vectores basados en el subgrupo C, a células del músculo liso, fibroblastos primarios, células dendríticas, etc.). Un ejemplo de tal vector sería un vector basado en Ad5 que comprende las HVR de por ejemplo Ad48 y al menos la fibra knob (el determinante principal del reconocimiento del receptor) de por ejemplo Ad35. Tales vectores se encuentran todos dentro del alcance de la presente invención relacionada con vectores adenovirales que comprenden hexones que son quiméricos con respecto a sus HVR.

El experto en la técnica podrá ahora, con el conocimiento proporcionado en el presente documento, construir y producir adenovirus recombinantes de replicación defectuosa, que tienen una o más HVR sustituidas por las HVR de otros adenovirus. Además, las secuencias de las HVR proporcionadas en el presente documento permitirán ahora eliminar esas secuencias y usar estas posiciones dentro del hexón para introducir otras sustancias, tales como ligandos de direccionamiento para dirigir los adenovirus a células de interés (*in vivo* e *in vitro*), sitios de unión a ligandos radioactivos para rastrear adenovirus *in vitro* y ciertos epítomos de células B (tal como se describe por Worgall *et al.* 2005).

La presente invención se refiere a un lote de un adenovirus recombinante de replicación defectuosa basado en Ad5, comprendiendo dicho adenovirus una proteína hexón quimérica en la que dicha proteína hexón comprende secuencias de las siete secuencias de regiones hipervariables (HVR) de Ad48 o Pan9. Se prefieren lotes en los que dichas secuencias de HVR son de Ad48.

Dicha proteína hexón conserva las secuencias de aminoácidos del virus de estructura principal entre las secuencias de HVR. Por tanto, pueden sustituirse las secuencias de HVR tal como se definen en el presente documento por una secuencia de HVR de otro serotipo, se mantienen las secuencias que unen las HVR y permanecen sin cambios. Esto permite producir virus que son estables debido a su estructura principal de hexón proporcionada por las secuencias que no son HVR. Por tanto, se prefiere que las secuencias entre las secuencias de HVR procedan del serotipo de Ad5.

En una realización altamente preferida, la presente invención proporciona lotes de adenovirus según la presente invención, en los que se seleccionan las secuencias de HVR de Ad48 o Pan9 de SEQ ID NO:24-30 y SEQ ID NO:52-58. En una realización, se selecciona la secuencia de HVR1 de SEQ ID NO: 24 y 52, se selecciona la secuencia de HVR2 de SEQ ID NO: 25 y 53, se selecciona la secuencia de HVR3 de SEQ ID NO: 26 y 54, se selecciona la secuencia de HVR4 de SEQ ID NO: 27 y 55, se selecciona la secuencia de HVR5 de SEQ ID NO: 28 y 56, se selecciona la secuencia de HVR6 de SEQ ID NO: 29 y 57, y se selecciona la secuencia de HVR7 de SEQ. ID NO: 30 y 58. El vector de estructura principal es de replicación defectuosa por delección de al menos una parte funcional de la región E1, preferiblemente por delección de toda la región funcional E1. Aunque el vector de estructura

principal comprende normalmente las demás regiones tempranas y tardías, el experto es consciente de las posibilidades proporcionadas en la técnica para complementar ciertas proteínas adenovirales requeridas por otros medios, por ejemplo, a través de complementación con virus auxiliares o transformando la célula de empaquetamiento de manera que comprenda los ácidos nucleicos requeridos integrados de manera estable en su genoma. Normalmente, los virus de la invención comprenden un genoma adenoviral con una delección de E1, y también preferiblemente una delección de E3 para proporcionar espacio para ácidos nucleicos heterólogos de interés que puedan clonarse en la región E1 o en la región E3, o ambas. Las regiones restantes, tales como E2, E4, las ITR y las regiones tardías generalmente están presentes, aunque estas pueden complementarse por separado durante la producción en una célula de empaquetamiento.

Los ejemplos preferidos de adenovirus quiméricos de replicación defectuosa según la presente invención son: Ad5HVR48(1-7), Ad5HVRPan9(1-7).

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de vectores de Ad5 recombinantes que contienen proteínas hexón quiméricas.

Las HVR de Ad2 según Crawford-Mikszá y Schnurr (1996), de Ad5 según Rux y Burnett (2000), de Ad5 según Rux *et al.* (2003) y de Ad5 según la presente invención se representan en la tabla I. La Tabla II proporciona las siete secuencias de HVR de adenovirus humanos Ad5, Ad11, Ad26, Ad35 y Ad48, y del adenovirus de chimpancé 68 (Pan9) según la definición de HVR de la presente invención. También se representan posiciones específicas dentro de las secuencias de hexones respectivas.

Se construyeron los vectores basados en Ad5 que contenían una o más HVR intercambiadas de Ad35 (subgrupo B) o Ad48 (subgrupo D).

Se sintetizaron genes de hexones parciales que contenían las secuencias deseadas por GeneArt (Alemania) y se clonaron como fragmentos de Apal-HpaI en un plásmido lanzadera que contenía el gen del hexón de Ad5 completo. Entonces se cortó un fragmento de Ascl-Ascl más grande de este plásmido lanzadera y se utilizó para sustituir el fragmento de Ascl-Ascl correspondiente en el cósmido de Ad5 pWE.Ad5.AfIII-rITR.dE3 (vector que porta una delección de la región E3 y basado en el cósmido pWE.Ad5.AfIII-rITR, véase el documento WO 02/40665). Entonces, se cotransfectaron los cósmidos mutantes de Ad5 junto con el plásmido adaptador pAdApt-Gag (que codifica para la proteína gag del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS)) en células PER.C6/55K (que albergaban el gen 55K E1B de Ad35 en células PER.C6[®], véase el documento WO 02/40665), y la recombinación homóloga produjo virus Ad5HVR35(1)-Gag recombinantes, Ad5HVR48(1)-Gag recombinantes y Ad5HVR48(1-7)-Gag recombinantes, en los que "1" indica la sustitución de sólo HVR1 y en los que "1-7" indica la sustitución de las siete HVR separadas. Estos vectores se purificaron en placa, se secuenciaron, se expandieron y se purificaron mediante centrifugación en gradiente de CsCl según procedimientos generales conocidos en la técnica. La secuencia del hexón en Ad5HVR48(1-7)-Gag se facilita en la figura 3.

Además de los tres virus mencionados anteriormente, se preparan también los siguientes vectores recombinantes: Ad5HVRPan9 (1-7) (figura 4).

Ejemplo 2. Inmunogenicidad de virus Ad5, Ad5HVR48(1) y Ad5HVR48(1-7) en ratones sin tratamiento previo y en ratones con inmunidad anti-Ad5.

Tal como se explicó resumidamente antes, se produjeron virus Ad5-Gag, Ad5HVR48(1)-Gag y Ad5HVR48(1-7)-Gag recombinantes viables en células de empaquetamiento. La producción de Ad5HVR48(1)-Gag era comparable al virus Ad5-Gag recombinante, mientras que la velocidad de crecimiento, el rendimiento y razón pv/ufp del virus Ad5HVR48(1-7)-Gag eran aproximadamente 2 veces inferiores que los del virus Ad5-Gag. En primer lugar, se comprobó la expresión de Gag en células A549 infectadas con 10^9 o 10^{10} pv de cada vector. Los datos de la HPLC indicaron que la expresión de Gag intracelular era suficiente y comparable entre los diferentes vectores (datos no mostrados), aunque la expresión de Ad5HVR48(1-7)-Gag era un tanto inferior que la de Ad5-Gag. Esto podría estar relacionado con la velocidad de crecimiento algo más lenta.

En primer lugar, se investigó la inmunogenicidad de los virus mediante la inmunización de ratones C57/BL6 sin tratamiento previo (4 ratones por grupo) con 10^9 , 10^8 y 10^7 pv de cada vector. Se evaluaron las respuestas de linfocitos T CD8⁺ provocadas por la vacuna mediante ensayos de unión a tetrámero D^b/AL11 durante dos semanas. Los resultados se muestran en la figura 1. Evidentemente, los tres vectores dieron como resultado respuestas inmunitarias comparables en estos ratones sin tratamiento previo, a pesar de las pequeñas diferencias en la velocidad de crecimiento y la expresión transgénica.

Posteriormente, se preinmunizaron ratones C57/BL6 con 2 inyecciones de 10^{10} pv de Ad5-vacío, respectivamente 8 y 4 semanas antes de la inmunización con los virus de interés (títulos de Acn frente a Ad5 de 8, 192-16, 384) para producir una inmunidad preexistente contra el vector de base de Ad5. Entonces (a las 8 semanas desde la primera preinmunización) se inmunizaron los ratones como anteriormente con 10^9 , 10^8 y 10^7 pv de Ad5-Gag, Ad5HVR48(1)-Gag y Ad5HVR48(1-7)-Gag recombinantes. De nuevo, se evaluaron las respuestas de linfocitos T CD8⁺ provocadas por la vacuna mediante ensayos de unión a tetrámero D^b/AL11 durante dos semanas. Los

resultados se muestran en la figura 2. Los resultados de la técnica de ELISPOT reflejaron los ensayos con tetrámero y proporcionaron resultados similares (datos no mostrados).

Tal como se esperaba, el vector Ad5-Gag encontró inmunidad preexistente en estos ratones preinmunizados, lo que dio como resultado una respuesta inmunitaria apenas detectable. El virus Ad5HVR48(1)-Gag tampoco pudo burlar los altos niveles de inmunidad anti-Ad5, lo que sugiere que la inmunidad preexistente no se limita al menos a HVR1 solo. De manera importante, la inmunogenicidad del virus Ad5HVR48(1-7)-Gag no se vio influida por la inmunidad preexistente inducida por Ad5, lo que indica que la mutación de las 7 HVR del hexón (tal como se identifica en el presente documento) de Ad5 y su sustitución por las HVR correspondientes de un serotipo raro (mostrado a modo de ejemplo por Ad48) da como resultado un vector que no se ve dificultado por la inmunidad preexistente contra la proteína de tipo natural. Se obtuvieron resultados similares en experimentos en los que se sensibilizaron los ratones dos veces con un vector de Ad5 vacío, lo que representa una situación con altos niveles de inmunidad preexistente (figura 5). Este experimento se realizó con 4 ratones C57/BL6 por grupo. Se preinmunizaron grupos de ratones con dos inyecciones de 10^{10} pv de Ad5-vacío para inducir inmunidad anti-Ad5. Los ratones que se preinmunizaron con Ad5-vacío tenían títulos de Acn frente a Ad5 de 8.192 - 16.384. Entonces, se sensibilizaron los ratones en el día 0 por vía intramuscular con 10^9 pv de Ad35-Gag y luego se reforzaron en el día 28 con o bien 10^9 pv de Ad5-Gag, 10^9 pv de Ad35-Gag o bien 10^9 pv de Ad5HVR48 (1-7)-Gag. Todas las inyecciones utilizaron un volumen de 50 μ l. Las flechas en el eje x indican las inmunizaciones. Se obtuvieron muestras de sangre en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 para ensayos de tinción de tetrámero Db/AL11 para cuantificar las respuestas de linfocitos T CD8+ provocadas por la vacuna. En el día 56, se realizaron también ensayos de ELISPOT con IFN-gamma y mostraron resultados comparables (datos no mostrados). Ad5-Gag no pudo llevar a cabo el refuerzo, presumiblemente debido a la inmunidad anti-Ad5 preexistente. Tampoco Ad35-Gag pudo llevar a cabo el refuerzo, presumiblemente debido a la inmunidad anti-Ad35 inducida por la inmunización de sensibilización. Ad5HVR48(1-7) reforzó eficazmente las respuestas, lo que confirma que este vector funciona como algún tipo de "serotipo" novedoso. Se llega a la conclusión de que Ad5HVR48(1-7) puede servir por tanto como vector de refuerzo eficaz en entornos en los que Ad5 no puede hacerlo, y en entornos en los que un vector heterólogo (tal como el Ad35) se usa como vector de sensibilización. Combinado con los estudios anteriores en la presentación, se concluye de manera global que los vectores representados por Ad5HVR48(1-7) son tanto vectores de sensibilización eficaces como vectores de refuerzo eficaces en entornos de inmunidad anti-Ad5 preexistente en los que Ad5 no puede hacerlo.

Estos resultados permiten ahora utilizar vectores basados en Ad5 en entornos de sensibilización-refuerzo, mientras que el reconocimiento de receptores (principalmente ocasionado por proteínas de fibra y pentón) permanece sin cambios.

Tabla I. Definiciones de regiones hipervariables dentro de la proteína hexón de adenovirus humanos Ad2 (según Crawford-Mikszs y Schnurr, 1996), Ad5 (según Rux y Burnett, 2000; Rux *et al.* 2003) y Ad5 (según la presente invención). Las definiciones de HVR de Ad5 de Rux y Burnett (2000) corresponden exactamente a las definiciones de Crawford-Mikszs basadas en la secuencia de Ad2. Obsérvese que estas definiciones de HVR se están todas cambiadas por 1 posición en esta tabla debido a la ausencia del residuo de metionina inicial en las definiciones de Rux y Burnett (2000) (HVR1: 137-181, etc.).

	Crawford-Mikszs (1996)	Rux (2000)	Rux (2003)	Rux (2003)	Presente invención
	Ad2	Ad5	Madre	Ad5	Ad5
HVR1	137-188	138-182	146-181	139-167	136-165
HVR2	194-204	188-194	199-221	184-198	188-194
HVR3	222-229	212-219	264-270	ninguno	212-220
HVR4	258-271	248-261	288-293	254-258	248-258
HVR5	278-294	268-283	307-330	272-280	268-281
HVR6	316-327	305-316	358-366	308	305-310
HVR7	433-465	422-450	482-489	420-422	418-451
HVR8			503-513	435-440	
HVR9			518-522	445-446	

Tabla II.

Ad5	Posición	Secuencia	
HVR1	136-165	DEAATALEINLEEEEDDDNEDEVDEQAEQQK	SEQ ID NO:17
HVR2	188-194	VEGQTPK	SEQ ID NO:18
HVR3	212-220	YETEINHAA	SEQ ID NO:19
HVR4	248-258	GILVKQQNGKL	SEQ ID NO:20
HVR5	268-281	STTEATAGNGDNL	SEQ ID NO:21
HVR6	305-310	TIKEGN	SEQ ID NO:22
HVR7	418-451	GGVINTETLTQVQPKTGQENGWEKDATEFSDKNE	SEQ ID NO:23
Ad48			
HVR1	136-150	EEKKNGGGSDANQMQ	SEQ ID NO:24
HVR2	173-185	IDATKEEDNGKEI	SEQ ID NO:25
HVR3	203-210	QDSDNYYG	SEQ ID NO:26
HVR4	238-251	AKFKTPEKEGEEK	SEQ ID NO:27
HVR5	261-277	DIPSTGTGGNGTQVNF	SEQ ID NO:28
HVR6	301-306	GKEDAS	SEQ ID NO:29
HVR7	414-446	DGAGTNAVYQGVQVKTNNTEWEKDTAVSEHNQ	SEQ ID NO:30
pan9			
HVR1	136-147	TYKADGETATEK	SEQ ID NO:52
HVR2	170-177	TDTDDQPI	SEQ ID NO:53
HVR3	195-205	HDITGTDEKYG	SEQ ID NO:54
HVR4	233-243	ANVKTGTGTTK	SEQ ID NO:55
HVR5	253-263	DNRSAAAAGLA	SEQ ID NO:56
HVR6	287-292	GTDDSS	SEQ ID NO:57
HVR7	400-432	DAVGRTDTYQGIKANGTDQTTWTKDDSVNDANE	SEQ ID NO:58

BIBLIOGRAFÍA

- Barouch DH *et al.* (2004) Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of preexisting anti-Ad5 immunity. *J Immunol* 172:6290
- Farina SF *et al.* (2001) Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol* 75:11603
- 5 Gall JGD *et al.* (1998) Construction and characterization of hexon-chimeric adenoviruses: specification of adenovirus serotype. *J Virol* 72:10260-10264
- Letvin NL *et al.* (2002) Prospects for vaccine protection against HIV-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* 20:73
- Pinto AR *et al.* (2003) Induction of CD8+ T cells to an HIV-1 antigen through a prime boost regimen with heterologous E1-deleted adenoviral vaccine carriers. *J Immunol* 171:6774
- 10 Shiver JW *et al.* (2002) Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415:331
- Shiver JW y Emini EA (2004) Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu Rev Med* 55:355
- 15 Shiver JW (2004) Development of an HIV-1 vaccine based on replication-defective adenovirus. *Keystone Symposium on HIV Vaccine Development: Progress and Prospects*, Whistler, Columbia Británica, Canadá.
- Sumida SM *et al.* (2004) Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. *J Virol* 78:2666
- Sumida SM *et al.* (2005) Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J Immunol* 174:7179-7185
- 20 Vogels R *et al.* (2003) Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell interaction and bypass of pre-existing adenovirus immunity. *J Virol* 77:8263
- Worgall S *et al.* (2005) Protection against *P. aeruginosa* with an adenovirus vector containing an OprF epitope in the capsid. *J Clin Invest* 115:1281-1289
- 25 Youil R *et al.* (2002) Hexon gene switch strategy for the generation of chimeric recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 13:311

REIVINDICACIONES

1. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa basado en Ad5, caracterizado porque dicho adenovirus recombinante de replicación defectuosa comprende una proteína hexón quimérica en la que se han sustituido las siete regiones hipervariables HVR1-7 de Ad5 tal como se definen en SEQ ID NO: 17-23 por las siete secuencias de regiones hipervariables HVR1 a HVR7 de Ad48 tal como se definen por SEQ ID NO: 24-30, o de Pan9 tal como se definen por SEQ ID NO: 52-58, y en el que las secuencias de la proteína hexón entre las secuencias de HVR proceden de Ad5.
2. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según la reivindicación 1, que es un adenovirus basado en Ad5 en el que se han sustituido las HVR1-7 de Ad5 tal como se definen por SEQ ID NO: 17-23 por las HVR1-7 correspondientes de Ad48 tal como se definen por SEQ ID NO: 24-30.
3. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de hexón quimérica de SEQ ID NO: 12 o de SEQ ID NO 16:
4. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según la reivindicación 3, que comprende la secuencia de hexón quimérica de SEQ ID NO: 12.
5. Adenovirus recombinante de replicación defectuosa según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés que va a suministrarse al huésped para fines profilácticos o terapéuticos.

Fig.1A

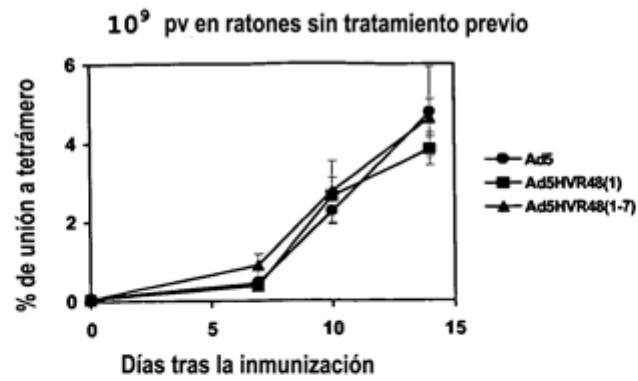


Fig.1B

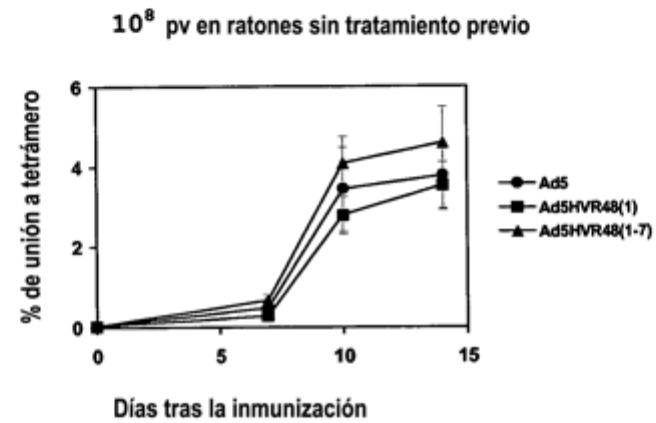


Fig.1C

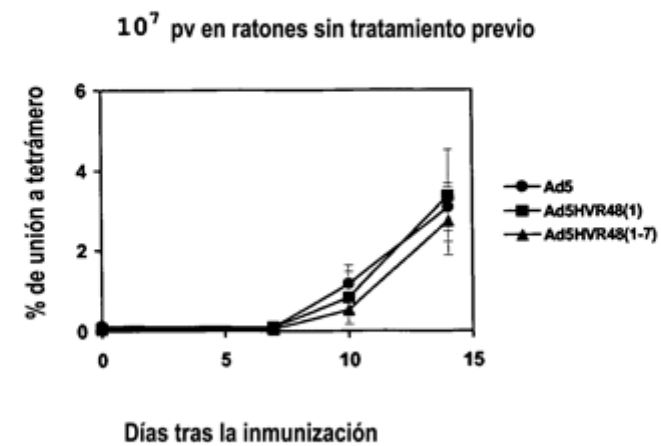


Fig. 2A

10^9 pv en ratones preinmunizados
con Ad5

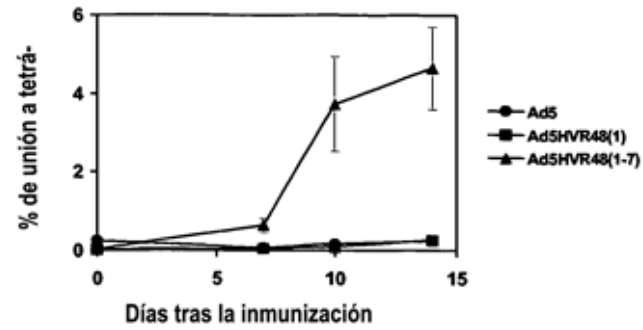


Fig. 2B

10^8 pv en ratones preinmunizados
con Ad5

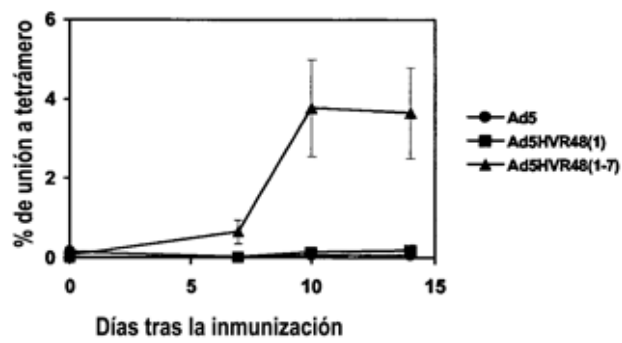


Fig. 2C

10^7 pv en ratones preinmunizados
con Ad5

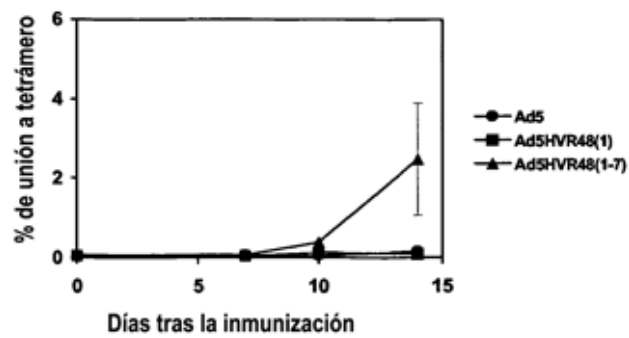


Fig. 3**Secuencia de la proteína hexón de Ad5HVR48(1-7)****(SEQ ID NO:12)**

```

M A T P S M M P Q W S Y M H I S G Q D A S E Y
L S P G L V Q F A R A T E T Y F S L N N K F R
N P T V A P T H D V T T D R S Q R L T L R F I
P V D R E D T A Y S Y K A R F T L A V G D N R
V L D M A S T Y F D I R G V L D R G P T F K P
Y S G T A Y N A L A P K G A P N P C E W E E K
K N G G G S D A N Q M Q T H V F G Q A P Y S G
I N I T K E G I Q I G I D A T K E E D N G K E
I Y A D K T F Q P E P Q I G E S Q W Q D S D N
Y Y G G R V L K K T T P M K P C Y G S Y A K P
T N E N G G Q A K F K T P E K E G E E P K E S
Q V E M Q F F D I P S T G T G G N G T N V N F
K P G K V V L Y S S E D V D I E T P D T H I S Y M
P Y K E D A S S R E L M Y Y N S T G N M G V L A
I A F R D N F I G L M Y Y N S T G N M G V L A
G Q A S Q L N A V V D L Q D R N T E L S Y Q L
L L D S I G D R T R Y F S M W N Q A V D S Y D
P D V R I I E N H G T E D E L P N Y C F P L D
G A G T N A V Y Q G V K V K T T N N T E W E K
D T A V S E H N Q I R V G N N F A M E I N L N
A N L W R N F L Y S N I A L Y L P D K L K Y S
P S N V K I S D N P N T Y D Y M N K R V V A P
G L V D C Y I N L G A R W S L D Y M D N V N P
F N H H R N A G L R Y R S M L L G N G R Y V P
F H I Q V P Q K F F A I K N L L L L P G S Y T
Y E W N F R K D V N M V L Q S S L G N D L R V
D G A S I K F D S I C L Y A T F F P M A H N T
A S T L E A M L R N D T N D Q S F N D Y L S A
A N M L Y P I P A N A T N V P I S I P S R N W
A A F R G W A F T R L K T K E T P S L G S G Y
D P Y Y T Y S G S I P Y L D G T F Y L N H T F
K K V A I T F D S S V S W P G N D R L L T P N
E F E I K R S V D G E G Y N V A Q C N M T K D
W F L V Q M L A N Y N I G Y Q G F Y I P E S Y
K D R M Y S F F R N F Q P M S R Q V V D D T K
Y K D Y Q Q V G I L H Q H N N S G F V G Y L A
P T M R E G Q A Y P A N F P Y P L I G K T A V
D S I T Q K K F L C D R T L W R I P F S S N F
M S M G A L T D L G Q N L L Y A N S A H A L D
M T F E V D P M D E P T L L Y V L F E V F D V
V R V H R P H R G V I E T V Y L R T P F S A G
N A T T

```

Fig. 4**Secuencia de la proteína hexón de Ad5HVRPan9(1-7)****(SEQ ID NO:16)**

```

M A T P S M M P Q W S Y M H I S G Q D A S E Y
L S P G L V Q F A R A T E T Y F S L N N K F R
N P T V A P T H D V T T D R S Q R L T L R F I
P V D R E D T A Y S Y K A R F T L A V G D N R
V L D M A S T Y F D I R G V L D R G P T F K P
Y S G T A Y N A L A P K G A P N P C E W T Y K
A D G E T A T E K T H V F G Q A P Y S G I N I
T K E G I Q I G T D T D D Q P I Y A D K T F Q
P E P Q I G E S Q W H D I T G T D E K Y G G R
V L K K T T P M K P C Y G S Y A K P T N E N G
G Q A N V K T G T G T T K E S Q V E M Q F F D
N R S A A A A G L A P K V V L Y S E D V D I E
T P D T H I S Y M P G T D D S S S R E L M G Q
Q S M P N R P N Y I A F R D N F I G L M Y Y N
S T G N M G V L A G Q A S Q L N A V V D L Q D
R N T E L S Y Q L L L D S I G D R T R Y F S M
W N Q A V D S Y D P D V R I I E N H G T E D E
L P N Y C F P L D A V G R T D T Y Q G I K A N
G T D Q T T W T K D D S V N D A N E I R V G N
N F A M E I N L N A N L W R N F L Y S N I A L
Y L P D K L K Y S P S N V K I S D N P N T Y D
Y M N K R V V A P G L V D C Y I N L G A R W S
L D Y M D N V N P F N H H R N A G L R Y R S M
L L G N G R Y V P F H I Q V P Q K F F A I K N
L L L L P G S Y T Y E W N F R K D V N M V L Q
S S L G N D L R V D G A S I K F D S I C L Y A
T F F P M A H N T A S T L E A M L R N D T N D
Q S F N D Y L S A A N M L Y P I P A N A T N V
P I S I P S R N W A A F R G W A F T R L K T K
E T P S L G S G Y D P Y Y T Y S G S I P Y L D
G T F Y L N H T F K K V A I T F D S S V S W P
G N D R L L T P N E F E I K R S V D G E G Y N
V A Q C N M T K D W F L V Q M L A N Y N I G Y
Q G F Y I P E S Y K D R M Y S F F R N F Q P M
S R Q V V D D T K Y K D Y Q Q V G I L H Q H N
N S G F V G Y L A P T M R E G Q A Y P A N F P
Y P L I G K T A V D S I T Q K K F L C D R T L
W R I P F S S N F M S M G A L T D L G Q N L L
Y V A N S A H A L D M T F E V D P M D E P T L L
Y V L F E V F D V V R V H R P H G V I E T V
Y L R T P F S A G N A T T

```

Fig. 5

