

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 276**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05738378 .8**  
96 Fecha de presentación: **02.05.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1743041**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2007**

54 Título: **Partículas modificadas de vectores víricos**

30 Prioridad:  
**03.05.2004 DE 102004021584**  
**16.08.2004 US 601902 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.11.2012**

73 Titular/es:  
**KOCHANЕК, STEFAN (50.0%)**  
**MAIENWEG 84**  
**89081 ULM, DE y**  
**KREPPEL, FLORIAN (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**KOCHANЕК, STEFAN y**  
**KREPPEL, FLORIAN**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 390 276 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Partículas modificadas de vectores víricos

La presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de partículas de vectores adenovíricos que comprende las etapas enumeradas en la reivindicación 1. Adicionalmente, la invención se refiere a partículas de vectores adenovíricos según se define en la reivindicación 6. Adicionalmente, la invención se refiere al uso de estas partículas de vectores adenovíricos como un medio terapéutico o diagnóstico.

Las partículas de vectores víricos tales como vectores adenovíricos de transferencia génica se usan *in vitro* e *in vivo* con objeto de transferir genes a células vivas con propósitos terapéuticos (terapia génica), con propósitos de vacunación y para estudios funcionales. Las partículas de vectores adenovíricos pueden producirse con altos títulos, su genoma es altamente estable y tienen la capacidad de transducir células proliferativas en reposo. Se pueden distinguir entre diferentes tipos de partículas de vectores adenovíricos: por ejemplo, están las denominadas partículas de vectores de primera generación (las funciones de E1 están delecionadas), las partículas de vectores de segunda generación (deleción adicional de las funciones de E2 y/o E4), partículas de vectores de alta capacidad (deleción de la mayoría o de todos los genes víricos). Además, también hay partículas de vectores adenovíricos de replicación competente (habitualmente denominados adenovirus oncolíticos), que se usan por ejemplo en la terapia tumoral. Adicionalmente también hay partículas de vectores de adenovirus quiméricos, en los que se han combinado las cápsides de diferentes serotipos. Un ejemplo es la sustitución de la proteína de fibra 5 del serotipo natural por una proteína de fibra derivada de un serotipo diferente, tal como por ejemplo, el serotipo 17 o el serotipo 9.

Se han encontrado adenovirus en numerosas especies. Se conocen más de 50 serotipos humanos diferentes, por ejemplo, Ad12 (Subgénero A), Ad3 y Ad7 (Subgénero B), Ad2 y Ad5 (Subgénero C), Ad8 (Subgénero D), Ad4 (Subgénero E), Ad40 (Subgénero F) (Wigand, 1986). Aparte de detectarse en seres humanos, también se han encontrado adenovirus en la mayoría de los vertebrados incluyendo chimpancés, ganado, cerdos, ratones y pollos. La mayoría de las partículas de vectores usadas actualmente para la transferencia génica se basan en adenovirus del tipo 5 (Ad5), aunque numerosos laboratorios también están trabajando en el desarrollo de partículas de vectores que o bien se basan en un serotipo diferente de un patógeno humano o bien son aisladas a partir de chimpancés, ganado u otras especies.

La transducción de las células por parte de las partículas de vectores de Ad5 tiene lugar a través de al menos dos receptores. Inicialmente, las partículas del vector se unen al dominio Knob de la proteína de fibra de la cápside del receptor de Cocksackie y de Adenovirus (CAR). Esta interacción induce modificaciones estructurales menores en la partícula del vector que permiten una interacción entre la proteína de la base pentona de las partículas del vector con las integrinas de la superficie celular. Finalmente, hay una captación mediada por integrina de las partículas del vector en la célula a través de una endocitosis mediada por receptor. Durante la captación de las partículas del vector, en el endosoma temprano tiene lugar un desensamblaje regulado y gradual de las partículas del vector mediante una participación sustancial de la proteasa de cisteína vírica p23, y que se completa después de abandonar el endosoma temprano y durante la entrada al núcleo. Este proceso depende del estado *redox* de la proteasa de cisteína p23. De este modo el ADN es transportado a los poros nucleares, siendo liberado de los remanentes de cápsides y finalmente translocado al núcleo en la última etapa del proceso de transducción.

Una de las limitaciones de las partículas de vectores adenovíricos para la transferencia génica es que muchos tejidos que representan un posible objetivo para la transferencia génica terapéutica con partículas de vectores adenovíricos no expresan el receptor CAR ni/o las integrinas necesarias. Las partículas de vectores adenovíricos transducen mal dichos tejidos incluso cuando se aplican a dosis altas. Por lo tanto, no es posible la transferencia génica terapéutica. Como ejemplos, pueden mencionarse aquí las células del sistema hematopoyético, la mayoría de los tipos de células tumorales, células neuronales, células musculares y células endoteliales. Además, el uso de vectores adenovíricos derivados de adenovirus aislados a partir de especies distintas a la que se va a tratar con el vector podría verse dificultada debido a las bajas eficacias de transducción.

Una limitación adicional de las partículas de vectores adenovíricos para la transferencia génica se hace apreciable después de la administración sistémica de las partículas del vector en el torrente sanguíneo. Por un lado hay interacciones con componentes sanguíneos celulares y no celulares tales como eritrocitos, plaquetas, el complemento o anticuerpos que son capaces de neutralizar las partículas víricas o que son responsables de reacciones tóxicas, y por otro lado también hay una captación mediada por CAR-/integrinas en los tejidos que no son el objetivo pretendido de aplicación de la partícula del vector. Igualmente limitantes son las interacciones de las partículas del vector con los componentes celulares del sistema inmunitario tales como las células de Kupffer, que pueden dar lugar a una neutralización de las partículas del vector y pueden inducir efectos secundarios indeseables.

El estándar de conocimiento actual incluye dos estrategias diferentes mediante las cuales se puede intentar modificar el tropismo de las partículas del vector vírico o se pueden evitar las interacciones indeseables de las partículas del vector vírico con, por ejemplo, anticuerpos.

La primera estrategia, denominada subsiguientemente como "estrategia genética", consiste en una modificación genética definida de las áreas expuestas al disolvente de varias proteínas de la cápside (por ejemplo, fibra, proteína

IX, Hexona). Aquí se intenta mejorar la transferencia génica en las células objetivo mediante la inserción genética de ligandos peptídicos en, por ejemplo, el dominio Knob de la proteína de fibra del Ad5 (Dmitriev, 1998). Esta estrategia genética presenta muchos inconvenientes concretos: (i) existe una significativa limitación con respecto al tamaño de los ligandos que se van a usar, ya que los ligandos grandes interfieren con el correcto plegamiento de las proteínas de la cápside modificadas. (ii) No es posible predecir si es posible la producción de las partículas del vector incluso después de la inserción genética de ligandos pequeños, debido a que el correcto plegamiento proteico puede verse alterado. Además, la estructura y la función biológica de los ligandos peptídicos en el contexto de las proteínas de la cápside del vector no son predecibles, y los ligandos peptídicos pequeños habitualmente sólo muestran una afinidad limitada por el receptor objetivo sobre la superficie de las células objetivo. (iii) Las sustanciales modificaciones genéticas, necesarias para una modificación exitosa del tropismo de las partículas del vector adenovíricas, dan lugar a un menor rendimiento en la producción de la partícula del vector. (iv) Para la producción de partículas de vectores modificadas genéticamente con un nuevo tropismo, especialmente cuando las mutaciones adicionales eliminan la interacción con el CAR, es necesario generar una nueva producción de línea celular para cada ligando. Esto es un obstáculo considerable e inhibe el eficiente cribado de los ligandos potenciales. (v) Todos los procedimientos genéticos están limitados por naturaleza a ligandos proteicos/peptídicos para la modificación del tropismo. Los péptidos que contienen aminoácidos no naturales no pueden aplicarse. Además, no pueden aplicarse otras sustancias distintas a las proteínas, por ejemplo, esteroides, otros compuestos aromáticos o carbohidratos y otros.

Una segunda estrategia, denominada subsiguientemente como "estrategia química", consiste en modificaciones químicas inespecíficas de todas las proteínas de la cápside expuestas al disolvente de la partícula del vector. Aquí se usan reacciones químicas con objeto de acoplar ligandos a grupos amino primarios naturales de la superficie de las partículas del vector. Este procedimiento modifica inespecíficamente todas las proteínas de la cápside y se lleva a cabo en condiciones oxidativas a un pH fisiológico o ligeramente superior (7,4-8,5). (Documento EP0694071B1 y Fisher, 2001). Las limitaciones de la estrategia química son: (i) las reacciones químicas con grupos éster activados para formar enlaces amida o con aldehídos para generar bases de Schiff que se usaron hasta ahora, se dirigen a grupos amino de la superficie de todas las proteínas de la cápside. Las proteínas individuales de la cápside pueden por lo tanto no ser modificadas específicamente. (ii) Debido a la ausencia de especificidad de ciertas proteínas de la cápside, la mayoría de los ligandos muestran una significativa reticulación con las proteínas de la cápside durante el acoplamiento. Consecuentemente, lo natural y para una transferencia génica eficiente necesariamente el desensamblaje de las partículas del vector puede verse gravemente deteriorado tras la captación celular de las partículas modificadas del vector. (iii) El acoplamiento químico de ligandos por ésteres activados en grupos amino primarios de la superficie de la cápside con la formación de enlaces amida estables mediante grupos aldehído con la formación de bases de Schiff no es reversible en condiciones biológicas. Mediante esto, la partícula del vector endosmolítico funciona, es decir, funciona para el escape endosómico después de la endocitosis mediada por receptor puede ser inhibida, y puede dar lugar a una baja eficacia en la transferencia génica.

El uso de residuos de cisteína para un acoplamiento específico de tiol es un procedimiento que se está usando en varias aplicaciones. Por ejemplo, Stubenrauch y col. publicaron un artículo que describe el acoplamiento de anticuerpos recombinantes a partículas pseudovíricas de polioma (VLP) con la ayuda de un residuo de cisteína como sitio de unión (Stubenrauch, 2001). Un ejemplo adicional del uso de residuos de cisteína para la formación de enlaces covalentes es el documento US 2003-219459 A1, que también describe un procedimiento para el acoplamiento de proteínas recombinantes a VLPs, mediante el cual el sitio de unión en la VLP no es un residuo de cisteína, sino que el compañero de acoplamiento porta un residuo de cisteína para la unión a la VLP. Importantemente, por oposición a las partículas de vectores víricos según se describen en este documento, las VLPs son partículas elaboradas sintéticamente y se ensamblan *in vitro*, es decir, fuera de las células vivas y su ensamblaje es totalmente independiente de elementos celulares tales como factores de transcripción o sistemas de chaperona y totalmente independientes de procesos celulares tales como la replicación del ADN. Por lo tanto, no son capaces, por ejemplo, de infecciones productivas, lo que significa que no son capaces de replicarse y multiplicarse en ciertas condiciones.

Recientemente, Wang y col. describieron mutantes del virus del mosaico de Cowpea (CPMV) que portan residuos de cisteína expuestos al disolvente modificados genéticamente en la superficie de la cápside (Wang, 2002). Estos mutantes sólo se produjeron con objeto de proporcionar bloques de construcción supramoleculares para la síntesis química. La producción del virus vegetal mutante sólo se consiguió bajo una rigurosa observación de las condiciones reductoras. Una desviación de estas condiciones condujo a una agregación y precipitación irreversibles mediante la formación de puentes de disulfuro interparticulares. Las partículas de estos virus mutantes simplemente servían como un elemento para la síntesis química, y las funciones biológicas no se analizaron.

Tras la aplicación de reactivos reductores y reactivos alquilantes sobre partículas del virus Ad5 no sólo se modificarán los tioles introducidos genéticamente expuestos al disolvente, sino también la proteasa de cisteína vírica p23 del adenovirus (Greber, 1996). Greber y col. mostraron que, para el serotipo 2 de adenovirus natural, después de la reducción de partículas víricas con ditiotreitól (DTT) y la subsiguiente alquilación/esterificación específica de tiol mediante diversos reactivos tales como N-etilmaleimida (NEM) o yodoacetamida (IAA), la proteasa de cisteína vírica p23 se convirtió en su forma reducida activa y subsiguientemente se alquiló. Además, Greber y col. demostraron que la proteasa que ha sido alquilada/esterificada de este modo era inactiva, y como consecuencia el adecuado desensamblaje de las cápsides después de la entrada en las células objetivo estaba dificultado de tal forma que el ADN vírico no podía translocarse al núcleo. Greber y col. demostraron que la infectividad de la partícula se había

reducido en 20 veces alquilando p23, por oposición a las partículas de control no tratadas. Además, Greber y col. demostraron un alquilación significativa pero inespecífica de las proteínas de la cápside que contienen cisteína Hexona, base Pentona y fibra, así como de la proteína del núcleo pV con NBM tras una reducción con DTT. Además, Jömvall y Philipson describieron un residuo de cisteína reactivo en una región accesible al disolvente de la proteína de la cápside Hexona que podía ser alquilada mediante reactivos basados en maleimida (Jörnvall, 1980).

El objetivo de esta invención es proporcionar un procedimiento mediante el cual las partículas de vectores adenovíricos pueden ser modificadas químicamente específicamente de una forma tal que se mantengan sus funciones biológicas naturales mediadas por las proteínas de la cápside y del núcleo, sólo pueden alterarse las funciones de unión al receptor y/o de fusión a la membrana. Un objetivo adicional de esta invención es proporcionar partículas de vectores adenovíricos que fueron producidas con este procedimiento.

La presente invención se refiere a partículas de vectores adenovíricos que comprenden proteínas de la cápside que comprenden un sitio de fijación para la modificación química específica de dichas partículas de vectores, comprendiendo dicho sitio de unión al menos un residuo de cisteína introducido genéticamente que no existe de forma natural en las proteínas de la cápside. Dichas partículas de vector comprenden adicionalmente un compañero de acoplamiento acoplado a dicho sitio de fijación. Dicho sitio de unión puede ser un residuo de cisteína que exista de forma natural en una proteína de la cápside. Las partículas del vector vírico pueden comprender uno o más compañeros de acoplamiento diferentes. Uno de dichos compañeros de acoplamiento puede tener uno o más sitios de fijación.

El (los) compañero(s) de acoplamiento está(n) acoplado(s) en dicho sitio de fijación a través de un enlace de disulfuro, tioéster y/o tioéter. El (los) compañero(s) de acoplamiento pueden ser ligandos específicos celulares, polímeros, especialmente derivados de PEG o derivados de HPMA, partículas de nanooro, pigmentos fluorescentes, sustancias magnéticas o sustancias bioquímicamente/catalíticamente activas.

La invención se refiere adicionalmente a partículas de vectores adenovíricos, en las que el sitio de unión tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó más residuos de cisteína, y en las que dos o más residuos de cisteína son consecutivos o están separados por 1, 2, 3 o más residuos de aminoácidos que son diferentes a la cisteína. Los sitios de unión comprenden preferiblemente los aminoácidos según la ID. SEC. Nº: 1, la ID. SEC. Nº: 2 o la ID. SEC. Nº: 3.

Las partículas de vectores adenovíricos de la presente invención derivan de vectores de transferencia génica basados en adenovirus. Las proteínas de la cápside se eligen de entre proteína de fibra, Hexona, base Pentona y proteína IX. La proteína de fibra comprende preferiblemente los aminoácidos según la ID. SEC. Nº: 13, la ID. SEC. Nº: 14 o la ID. SEC. Nº: 15.

La partícula del vector de adenovirus se puede obtener mediante el procedimiento según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la generación de una partícula de un vector adenovírico según la presente invención, que comprende las etapas según se enumeran en la reivindicación 1. En particular, dicho procedimiento comprende las etapas de: i) generación de una partícula de un vector adenovírico o en líneas celulares de empaquetamiento, que comprende proteínas de la cápside que comprenden un sitio de fijación para la modificación específica de las partículas del vector, comprendiendo dicho sitio de fijación al menos un residuo de cisteína; ii) lisado de las células de empaquetamiento y la subsiguiente purificación de dichas partículas de vectores víricos en tampones con un pH desde 5,0 hasta 9,0, preferiblemente desde 6,8 hasta 7,4, y más a 7,3, en tampones con poco oxígeno o sin oxígeno opcionalmente complementados con reactivos reductores en una atmósfera de Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>; iii) poner en contacto los compañeros de acoplamiento con dichas partículas de vectores víricos y realizar una reacción de acoplamiento con la formación de un enlace de tioéter, disulfuro o tioéster en tampones con poco oxígeno/sin oxígeno complementados con reactivos reductores en una atmósfera de Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de partículas de vectores adenovíricos según la presente invención como un medio terapéutico, profiláctico o diagnóstico en seres humanos, primates y otros vertebrados tales como ganado, cerdos, aves, peces o roedores.

Las siguientes figuras explican la invención.

La Fig. 1 representa los resultados del alquilación del mismo número de partículas de vectores Ad1Cys, Ad3Cys, Ad5Cys, así como de un vector de control no modificado genéticamente con partículas de monomaleimida-nanooro y la subsiguiente separación de las proteínas de la cápside mediante SDS-PAGE seminatural con una tinción de plata específica para oro. (+) significa preincubación con el reactivo reductor TCEP (clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina) (10 mM, (-) significa sin preincubación con agente reductor, "KV" significa partículas de vector de control no modificadas genéticamente incubadas con monomaleimida-nanooro, "Ad1Cys" significa partículas del vector Ad1Cys incubadas con monomaleimida-nanooro, "Ad3Cys" significa partículas del vector Ad3Cys incubadas con monomaleimida-nanooro, "Ad5Cys" significa partículas del vector Ad5Cys incubadas con monomaleimida-nanooro, "Ad1Cys sin oro" significa partículas del vector Ad1Cys no incubadas con monomaleimida-nanooro.

La Fig.2 demuestra la modificación química con éxito de grupos tiol introducidos genéticamente en el vector Ad1Cys tras la protección mediante una amino-PEGilación de las partículas del vector. Se muestran los resultados típicos de la citometría de flujo para analizar la expresión de la EGFP en células K562. "pMOI" significa partícula MOI (número de partículas físicas del vector usado para transducir las células K562). "Ad1Cys no modificado" es el vector Ad1Cys no modificado químicamente. "Af1Cys + SPA-PEG" significa vector Ad1Cys aminoPEGilado. "Ad1Cy + SPA-PEG + Tf-Mal" significa vector Ad1Cys aminoPEGilado que, después de la modificación con amina, fue modificado específicamente con tiol con maleimida-transferina (Tf-Mal).

El término "partícula de vector" o "partícula de vector vírico" o "partícula de vector de virus" según se usa aquí se refiere a constructos víricos naturales o artificiales para la captación, multiplicación, expresión o transporte de ácidos nucleicos en células. El término no incluye ninguna partícula de vector producida sintéticamente, es decir, partículas producidas sin la ayuda de funciones y procesos celulares que van más allá de la expresión de las proteínas de la cápside. Algunos ejemplos de partículas de vector son virus con un alto grado de complejidad, tales como adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, lentivirus o baculovirus. Las partículas de vectores están diseñadas de tal forma que contienen al menos un polinucleótido terapéutico o analítico. Éste puede ser expresado y/o replicado. Las partículas del vector también pueden incluir secuencias de polinucleótidos que pueden tener características reguladoras. Además, el término partícula de vector también puede incluir partículas de vectores que sean capaces de una replicación lítica en células distintas a las de producción. El término "ácido nucleico terapéutico" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que, tras su administración a una célula de un organismo, confiere un beneficio terapéutico, profiláctico o diagnóstico.

El término "modificación genética" según se usa aquí, se refiere modificaciones de ácidos nucleicos de las secuencias de polinucleótidos de las proteínas de la cápside naturales de las partículas del vector vírico, que dan como resultado secuencias de aminoácidos modificadas de estas proteínas. Estas modificaciones se realizan mediante procedimientos estándar de biología molecular. Dicha modificación genética puede pasarse al genoma de replicación después de la replicación de la partícula del vector, y con esto también a las partículas del vector replicante. Además, las secuencias de polinucleótidos modificadas también pueden ser parte de una línea celular de producción transfectada de forma estable con la secuencia de polinucleótidos modificada, o parte de un plásmido de producción que no está presente en la preparación del vector purificado según se usa para la modificación química.

El término "modificación química" según se usa aquí se refiere a la modificación de las proteínas de la cápside en partículas de vector estructuralmente intactas en ausencia de células de producción mediante reacciones químicas y con la formación de enlaces químicos covalentes. Dicha modificación química no se pasa al genoma de replicación tras la replicación de la partícula de vector, y con esto tampoco a las partículas de vector replicadas.

El término "tropismo" según se usa aquí se refiere a la capacidad de las partículas de vector de infectar/transducir ciertas células según su composición superficial.

El término "modificación del tropismo" según se usa aquí se refiere a un procedimiento para alterar la capacidad de las partículas del vector de infectar/transducir ciertas células según su composición superficial. Con objeto de modificar el tropismo de la partícula del vector, a las partículas se les proporcionan ciertas características tales como ciertas afinidades por los receptores en la superficie de las células objetivo que no poseen por naturaleza. Además, tras la modificación del tropismo naturalmente inherente, pueden reducirse o eliminarse características tales como la afinidad por ciertos receptores celulares, por ejemplo, la afinidad por CAR en el caso de Ad5.

El término "proteína de la cápside" según se usa aquí se refiere al grupo de proteínas que está implicado de forma natural en la formación de la cápside de la partícula del vector y es accesible por el disolvente cuando la partícula del vector está en disolución, por ejemplo, la proteína de fibra o la Hexona de las partículas del vector Ad, o VP2 de partículas de vectores AAV. En el caso de partículas de vectores víricos con cubierta se refiere a los componentes proteicos de la partícula que son accesibles por el disolvente circundante cuando la partícula está en disolución, por ejemplo, los dominios extramembranales de las proteínas de la envoltura de las partículas del vector de retrovirus.

El término "acoplamiento" según se usa aquí, se refiere a la modificación química específica de tiol de grupos tiol en la superficie de partículas de vectores modificadas genéticamente con la formación de enlaces químicos covalentes. Como ejemplo se pueden mencionar la formación de enlaces tioéter mediante la reacción de grupos tiol reducidos en la superficie de la partícula del vector con grupos maleimida. Además, el acoplamiento se refiere a un procedimiento que mantiene la integridad estructural de las partículas del vector y las funciones naturales de sus proteínas de la cápside y del núcleo. Sólo pueden alterarse las características de unión al receptor y/o de fusión a la membrana.

El término "compañero de acoplamiento" según se usa aquí, se refiere a moléculas que están fijadas covalentemente y específicamente con tiol a partículas de vectores modificadas genéticamente (acoplamiento). Las funciones de los compañeros de acoplamiento pueden ser la introducción de nuevos grupos reactivos adicionales en la superficie de la partícula del vector, la introducción de nuevas especificidades de receptor o la protección de las partículas del vector, o la introducción de nuevas propiedades catalíticas o físicas. Adicionalmente, los compañeros de acoplamiento son moléculas que en la segunda o en las subsiguientes etapas del proceso de acoplamiento, se

fijan a otro compañero de acoplamiento que ya ha sido fijado a la superficie de la partícula del vector.

El término "dominios expuestos al disolvente" según se usa aquí se refiere a dominios de las proteínas de la cápside de partículas de vectores víricos estructuralmente intactos en disolución que están en contacto físico con el disolvente. El contacto físico con el disolvente puede generarse mediante la aplicación de reactivos reductores o de un tratamiento enzimático.

El término "número de oxidación" según se usa aquí se refiere al número romano formal que describe el estado de oxidación del átomo de azufre de un residuo de cisteína y de derivados de un residuo de cisteína según se obtienen mediante modificaciones químicas, y se calcula mediante la fórmula: 6-("número de electrones asignados al átomo de azufre del residuo/derivado de cisteína") = número de oxidación. El número de electrones asignado al átomo de azufre del residuo/derivado de cisteína se determina según las asunciones formales de que 1) el átomo de azufre y el átomo de carbono  $\beta$  de un residuo/derivado de cisteína tienen la misma electronegatividad, y que 2) los átomos de azufre tienen una electronegatividad mayor que los átomos de hidrógeno. Por lo tanto, el número de oxidación del azufre en un grupo tiol reducido de un residuo de cisteína según se usa aquí es de -1 y en un enlace de disulfuro 0.

Un aspecto de esta invención se refiere a vectores de adenovirus que comprenden proteínas de la cápside con un sitio de fijación para la modificación química específica de las partículas del vector, mediante la cual el sitio de fijación es un residuo de cisteína que no existe de forma natural en la proteína de la cápside. Dichas partículas de vectores víricos comprenden compañeros de acoplamiento fijados a un sitio de fijación, mediante lo cual el sitio de fijación puede ser un residuo de cisteína existente de forma natural o un residuo de cisteína que fue introducido en la proteína de la cápside mediante la tecnología del ADN recombinante.

Las partículas del vector pueden producirse mediante una combinación de procedimientos genéticos y químicos. Los grupos tiol reactivos se introducen a través de residuos de cisteína en los dominios de la proteína de la cápside expuestos al disolvente, por ejemplo, el dominio de la fibra Knob de Ad5, mediante modificaciones genéticas. Estas modificaciones genéticas permiten el uso de líneas/sistemas celulares de producción convencionales y habitualmente no limitan el rendimiento de la producción. Los grupos tiol introducidos genéticamente se mantienen o se transforman en un reactivo, es decir, en estado reducido por agentes reductores. Los tipos y las concentraciones de los reactivos reductores no afectan a la intensidad de las partículas del vector. Los grupos tiol reactivos expuestos al disolvente obtenidos en las proteínas de la cápside se usan para un acoplamiento químico específico y covalente de cualquier molécula, tal como ligandos para la modificación del tropismo y/o polímeros para la protección de las partículas del vector y/o moléculas marcadoras para marcar partículas del vector y/o enzimas para ciertas actividades catalíticas de la superficie de la partícula del vector. Se forman enlaces covalentes bioirreversibles (tioéter, tioéster o biorreversibles, es decir, en las condiciones reductoras del endosoma o el citosol enlaces covalentes reversibles (disulfuros) entre el compañero de acoplamiento y la partícula del vector eligiendo diferentes reactivos químicos para el acoplamiento. Además, puede usarse una combinación de diferentes compañeros de acoplamiento diferentes proporciones y/o diferentes reactivos químicos para acoplarnos al mismo tiempo. Además, los compañeros de acoplamiento pueden introducir nuevos sitios de fijación sobre los cuales pueden fijarse los compañeros de acoplamiento durante rondas adicionales de acoplamiento.

Un aspecto adicional se refiere a la producción de las partículas de vectores adenovíricos según la presente invención, que comprende las siguientes etapas: i) producción de la partícula del vector vírico en líneas de producción celulares, que comprenden un sitio de fijación para la modificación específica de dicha partícula de vector vírica, mediante lo que el sitio de fijación consiste en al menos un residuo de cisteína, ii) lisis celular y/o purificación de la partícula del vector en sistemas tamponantes con poco oxígeno/sin oxígeno que están opcionalmente complementados con un reactivo reductor y saturados con Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>, iii) poner en contacto las partículas del vector vírico de la etapa ii) con un compañero de acoplamiento y realizar una reacción de acoplamiento con la formación de enlaces tioéter, disulfuro o tioéster en sistemas tamponantes con poco oxígeno/sin oxígeno que estén complementados con reactivos reductores y saturados con Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> con un pH en el intervalo desde 5,0 hasta 9,0, preferiblemente desde 6,8 hasta 7,4, y más preferiblemente a 7,3. Las partículas del vector aislado pueden almacenarse antes de un procesamiento adicional en los anteriormente enumerados tampones.

La base del procedimiento descrito es la introducción genética de uno o más grupos tiol reactivos en dominios expuestos al disolvente de las proteínas de la cápside las partículas del vector vírico a través de residuos de cisteína con los aminoácidos adecuados en su adyacencia que permiten el control del estado *redox* de los residuos de cisteína, así como una eficiente alquilación/esterificación. Si se está insertando más de un residuo de cisteína, dos o más residuos de cisteína pueden ser consecutivos o pueden estar separados por aminoácidos distintos a cisteína. Se prefieren los motivos de secuencias (i) LIGGGCGGGID ("1Cys") (ID. SEC. N°: 1), (ii) LIGCGCGGID ("3Cys") (ID. SEC. N°: 2), (iii) LICCCCCID ("5Cys") (ID. SEC. N°: 3). El experto en la materia puede identificar con facilidad que también pueden usarse motivos con diferentes cifras de cisteínas (por ejemplo, 2, 4, 6 o más) y/o motivos de secuencia más largos. Además, es evidente que también pueden usarse motivos con aminoácidos intercalados y flanqueantes distintos a glicina, serina, alanina, leucina, ácido aspártico o combinaciones de los mismos.

Además, es obvio que el procedimiento de modificación genética también puede incluir secuencias que contienen cisteína con especificidad intrínseca de receptor o cargas, por ejemplo, secuencias que son capaces de fijarse en los receptores de superficie de las células y/o facilitar el proceso de purificación de las partículas del vector.

Los residuos de cisteína pueden insertarse, por ejemplo, en el bucle HI del dominio Knob expuesto al disolvente de la proteína de fibra de la cápside del serotipo 5 del adenovirus. El experto en la materia puede identificar con facilidad que junto con los dominios expuestos al disolvente del bucle HI de la proteína de fibra, también hay áreas expuestas al disolvente en otras regiones de la proteína de fibra, así como regiones expuestas al disolvente en las proteínas de la cápside tales como Hexona, base Pentona y Proteína IX son adecuadas para la inserción de los anteriormente mencionados activos o similares. Además, es obvio que no sólo pueden usarse vectores adenovíricos, y en los virus usados pueden modificarse cisteínas que existen potencialmente de forma natural son accesibles, con el procedimiento según se describe en este documento. Como un ejemplo, pueden mencionarse las proteínas Up2 y Up3 del virus Adeno-asociado (AAV) y sus subtipos, así como la proteína de la envoltura de retrovirus.

Adicionalmente, los procedimientos se aplican a vectores adenovíricos que son modificados de tal forma que ya no portan de forma natural la proteína de fibra sino otras proteínas trimerizantes para la sustitución parcial o completa de la fibra homotrimérica. Además, los procedimientos se aplican a vectores híbridos formados por proteínas de la cápside derivadas de diferentes tipos de virus, por ejemplo, vectores híbridos formados por proteínas de adenovirus y reovirus. Además, el procedimiento se aplica a vectores quiméricos que han sido formados con diferentes serotipos de Ad. Además, el procedimiento se aplica a vectores que carecen de los componentes naturales de la cápside, por ejemplo, vectores de Ad que carecen de la proteína de fibra o de partes de la proteína de fibra. Además, el procedimiento se aplica a vectores víricos quiméricos distintos de los adenovirus que están formados por diferentes serotipos y a vectores pseudotipados retro y lentivíricos.

La cisteínas pueden incorporarse en las partículas del vector mediante procedimientos establecidos de la tecnología del ADN recombinante. Para este propósito, se están incorporando secuencias de ácidos nucleicos que codifican para los motivos de secuencias de cisteína en secuencias de polinucleótidos que codifican para la proteína de la cápside de la partícula del vector que se va a modificar. Las secuencias de polinucleótidos así modificadas se usan para la producción de las partículas del vector en líneas celulares de producción, por ejemplo, en células N52E6, en células 293 o en células PER C6, por ejemplo, en el caso de partículas de vector de Ad. El experto en la materia está familiarizado con líneas celulares y procedimientos de producción que se usan para la producción que vectores adenovíricos y para la producción de otros vectores víricos tales, por ejemplo, vectores basados en virus adenoasociados, retrovirus o lentivirus. En el caso de partículas del vector de Ad, el ácido nucleico es en primer lugar transfectedo en las células de producción (por ejemplo, mediante el procedimiento de Ca-fosfato). Subsiguientemente, las líneas celulares de producción producen partículas del vector que pueden ser recogidas mediante lisis en un tampón de lisis que habitualmente está saturado con oxígeno atmosférico, tal como disolución salina tamponada con fosfato (PBS) o en medio de cultivo celular. Dado que las cantidades de las partículas de vector obtenidas son habitualmente relativamente bajas en esta primera etapa de producción, las partículas del vector obtenidas mediante lisis se usan de nuevo para infectar líneas celulares de producción con objeto de obtener mayores cantidades de partículas del vector. Esto se realiza añadiendo las partículas del vector obtenidas mediante lisis, y opcionalmente purificado y/o concentrado, a las células de producción que se van a infectar. Este procedimiento se repite con unas cifras de células de producción crecientes en hasta 15 veces (preferiblemente 3-10 veces). Este proceso se denomina amplificación en serie. Los tampones que se usan para lisar las células pueden contener reactivos reductores tales como tris-(2-carboxietil)-fosfina TCEP (1-10 mM), ditioneitol DTT (1-10 mM), ascorbato (10-100 mM) u otros. Adicionalmente durante las amplificaciones en serie, justo antes de la inyección de las células de producción con las partículas del vector, pueden añadirse reactivos antioxidantes tales como ascorbato (50-100 mM) o vitamina E (1-100 mM) al medio de cultivo celular con objeto de evitar la formación de agregados de partículas del vector, antes de la inyección en el medio oxidativo del medio de cultivo celular.

Alternativamente al uso de tampones de lisis y saturados con oxígeno atmosférico opcionalmente complementados con reactivos reductores, durante las amplificaciones en serie pueden usarse sistemas tamponantes desgasificados, que pueden obtenerse a vacío, por aplicación de ultrasonidos o por una combinación de ambos. Además, pueden usarse sistemas tamponantes que han sido depleccionados en oxígeno o reducidos en oxígeno mediante la aplicación de argón, dióxido de carbono, nitrógeno o helio. También pueden añadirse agentes reductores a los tampones desgasificados. Obviamente pueden aplicarse todas las combinaciones de los procedimientos mencionados.

Los sistemas tamponantes que se usan para la lisis celular también pueden usarse para todos los procedimientos de purificación y concentración después de la lisis de las células de producción durante y después de las amplificaciones en serie de las partículas de vector con cápside modificada genéticamente. Esto también incluye todos los procedimientos de purificación y de intercambio del tampón previos a la modificación química de las partículas del vector (por ejemplo, centrifugación en gradiente por etapas con CsCl, desalinización con tamicos, diálisis). Se debe tener especial cuidado en la aplicación de materiales y sistemas tamponantes que estén exentos de iones metálicos divalentes tales como Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> con objeto de asegurar la estabilidad y la reactividad de los grupos tiol de las partículas. Pueden añadirse agentes quelantes tales como EDTA o EGTA a los tampones. Todos los sistemas tamponantes mencionados también se usan para el almacenamiento de las partículas del vector, así como para la purificación y el almacenamiento de las partículas del vector modificadas químicamente o parcialmente modificadas químicamente.

Mediante procedimientos químicos específicos de tiol, se fijan diversas moléculas (denominadas en lo sucesivo

compañeros de acoplamiento) a las partículas del vector mediante la formación de enlaces químicos covalentes (denominados en lo sucesivo "acoplamiento"). Aquí es esencial que se mantenga la integridad de las partículas del vector así como las funciones naturales de las partículas del vector mediadas por las proteínas del núcleo y de la cápside; sólo pueden alterarse las funciones naturales de unión al receptor y/o de fusión a la membrana. Igualmente es esencial mantener la integridad estructural de los compañeros de acoplamiento.

Las modificaciones químicas se llevan a cabo en sistemas tamponantes con un intervalo de pH de 5,0 hasta 9,0, preferiblemente desde pH 6,8 hasta 7,4, y más preferiblemente a 7,3. Las modificaciones químicas se llevan a cabo en el sistema tamponante mencionado previamente. El sistema tamponante preferido es un tampón exento de oxígeno y de cationes metálicos que contiene disolución salina tamponada con fosfato 100 mM (PBS). El experto en la materia está familiarizado con el uso de otros sistemas tamponantes inertes tales como los basados en HEPES. Además, las reacciones químicas que se realizan sin modificar el pH también pueden realizarse en agua. El sistema tamponante usado y el tubo de reacción usado deben estar exentos de cationes metálicos divalentes sales tales como  $Mg^{2+}$  o  $Mu^{2+}$  con objeto de asegurar la estabilidad de los grupos tiol reducidos. Alternativamente, pueden aplicarse quelantes tales como EDTA con objeto de detener interacciones indeseables entre los grupos tiol y los cationes metálicos divalentes.

El acoplamiento con tioles insertados genéticamente de las partículas del vector tiene lugar a través de la formación de enlaces tioéter o tioéster (covalentes bioirreversibles) o mediante la formación de disulfuro (biorreversible). La formación de tioéteres tiene lugar con reactivos que comprenden grupos maleimida, la formación de los enlaces de disulfuro mediante reacción de intercambio de disulfuro con grupos ditiopiridilo. El experto en la materia está familiarizado con los mecanismos y velocidades de reacción. Este conocimiento permite variantes del procedimiento de acoplamiento según los requisitos específicos de los compañeros de acoplamiento.

Los compañeros de acoplamiento pueden acoplarse directamente a las partículas del vector haciendo uso de características naturales intrínsecas del compañero de acoplamiento. Esto puede tener lugar, por ejemplo, usando grupos tiol reducidos existentes de forma natural presentes en el compañero de acoplamiento o añadiendo reactivos reductores al compañero de acoplamiento para obtener grupos tiol reducidos, por ejemplo, a partir de puentes de disulfuro presentes en el compañero de acoplamiento. Además, las reacciones de intercambio de disulfuro pueden aplicarse para el acoplamiento directo de los compañeros de acoplamiento.

Adicionalmente, también se pueden aplicar compañeros de acoplamiento modificados genéticamente tales como proteínas recombinantes para su acoplamiento específico de tiol con partículas del vector, que recibieron mediante codificación genética cisteínas individuales o puentes de disulfuro para el acoplamiento a través de enlace de disulfuro o de reacciones de intercambio de disulfuro.

Los compañeros de acoplamiento también pueden acoplarse a los tioles de la superficie de las partículas del vector tras la modificación química covalente del compañero de acoplamiento. Aquí los compañeros de acoplamiento son modificados químicamente de una forma tal que, después de esta modificación, poseen grupos reactivos específicos de tiol acoplados covalentemente que, en una etapa subsiguiente, son aplicados para el acoplamiento específico con los grupos tiol de las partículas del vector. Los grupos reactivos específicos de tiol que son insertados mediante una modificación química del compañero de acoplamiento son grupos maleimida para la formación de grupos tioéter, o ditiopiridilo para la formación de puentes de disulfuro, o derivados de yodoacetilo para la formación de tioésteres. Éstos pueden insertarse en el compañero de acoplamiento mediante reactivos de acoplamiento tales como éster de N-[E-maleimidacaproiloxi]succinimida (EMCS) o succinimidil-6-[3-(2-piridilditio)-propionainido]hexanoato (SPDP). El experto en la materia está familiarizado con la aplicación de reactivos adicionales.

La modificación química de los compañeros de acoplamiento para el acoplamiento con los tioles de la superficie de la partícula del vector también puede usarse para insertar grupos químicos que no están directamente implicados en el proceso de acoplamiento y que sirven como separadores entre los compañeros de acoplamiento y las partículas del vector. Un ejemplo es el uso N-hidroxisuccinimid-polietilenglicol-3400-maleimida (NHS-PEG3400-Mal). El uso de separadores en la modificación química de uno o más compañeros de acoplamiento puede servir para aumentar la eficacia de reacción mediante la reducción de los impedimentos estéricos, así como para aumentar la potencia del compañero de acoplamiento al exponer eficazmente sus dominios de unión al receptor o al introducir grupos reactivos adicionales para un acoplamiento continuado. Obviamente, aparte del NHS-PEG-3400-Mal, también pueden usarse otros separadores.

Claramente, también se pueden usar compañeros de acoplamiento que porten, por sí mismos, grupos reactivos para el acoplamiento de un segundo compañero de acoplamiento en orden cronológico. Además, es obvio que también puede ocurrir el acoplamiento simultáneo de varios compañeros de acoplamiento diferentes en las partículas del vector.

Los compañeros de acoplamiento para el acoplamiento específico de tiol en las partículas pueden realizar diferentes funciones.

La primera función consiste en la mediación de nuevas especificidades de receptor para un remarcado de las partículas del vector que fueron modificadas de esta forma. Para este propósito pueden aplicarse proteínas como la

transferrina, mediante lo cual las características de los compañeros de acoplamiento relativas a la unión al receptor son transferidas a las partículas del vector mediante un acoplamiento covalente. Para el experto en la materia es obvio que no sólo pueden usarse aquí proteínas con ciertas especificidades de receptor (por ejemplo, transferrina, factor de crecimiento epidérmico EGF, factor básico de crecimiento de los fibroblastos bFGF), sino también moléculas de otras categorías de sustancias. Como un ejemplo pueden mencionarse aquí mono o polisacáridos tales como galactosa, que pueden mediar en la unión específica al receptor. Un ejemplo adicional para la aplicación de los compañeros de acoplamiento diferentes de las proteínas son las hormonas esteroideas, que también pueden mediar en la especificidad del receptor. Además, pueden usarse para el acoplamiento de moléculas con características de unión al receptor que fueron diseñadas con procedimientos racionales tales como Modelado Molecular o derivados de éstas, y moléculas que han sido sintetizadas químicamente o que han sido aisladas a partir de materiales naturales. También pueden usarse moléculas más complejas formadas por numerosas subunidades que pueden estar unidas covalentemente o incluso no covalentemente, por ejemplo, virus o partículas de vectores víricos, como compañeros de acoplamiento para acoplarse con grupos tiol de la superficie de la partícula del vector. Los vectores según la presente invención también pueden acoplarse con compañeros de acoplamiento, mediante lo cual desarrollan un tropismo para más de un tipo celular. El acoplamiento de los compañeros de acoplamiento a residuos de cisteína en la superficie de la partícula del vector también puede realizarse antes, al mismo tiempo o después de las modificaciones químicas de la superficie de la partícula del vector que implican grupos reactivos distintos a los tioles. Por ejemplo, antes, al mismo tiempo o después de la modificación superficial con HPMA reactivo con aminas, o antes, al mismo tiempo o después de la modificación superficial con HPMA reactivo con aminas, y las partículas del vector así obtenidas podrían someterse a una modificación del tiol.

La segunda función consiste en una protección estérica de las partículas del vector modificadas químicamente mediante los compañeros de acoplamiento, con objeto de evitar, por ejemplo, interacciones indeseadas con anticuerpos o con el sistema complemento o con componentes celulares del sistema inmunitario. Para este propósito pueden aplicarse derivados de polímeros sintéticos tales como polietilenglicol (PEG) con diferentes pesos moleculares y longitudes de cadena. Un ejemplo adicional de un polímero sintético cuyos derivados son adecuados para la protección de las partículas del vector y pueden ser acoplados específicamente mediante uno de los mecanismos descritos anteriormente sobre las partículas del vector modificadas genéticamente es pHPMA (Fisher, 2001). Además, pueden usarse moléculas que confieran nuevas especificidades de receptor, como las propias proteínas, para proteger las partículas del vector.

Las funciones de mediación de nuevas especificidades de receptor o mediante un compañero de acoplamiento y la protección pueden unificarse mediante el acoplamiento simultáneo o cronológico de dos o más compañeros de acoplamiento en la misma partícula del vector, mediante lo que por un lado se crea un tropismo y por otro lado se crea protección. Aquí es obvio que ambos compañeros de acoplamiento pueden acoplarse directamente sobre los grupos tiol reactivos de la superficie de la cápside, o que un compañero de acoplamiento ofrece grupos reactivos para el acoplamiento específico del segundo compañero de acoplamiento con el primero. Estos grupos reactivos pueden ser, por ejemplo, grupos tiol, amino o carboxilo. Además, es obvio que también puede usarse un único compañero de acoplamiento que combine ambas funciones de marcaje y de protección.

Una tercera función de los compañeros de acoplamiento puede ser el marcaje de las partículas del vector, por ejemplo, para la transferencia analítica de genes, por ejemplo, con un pigmento fluorescente o con partículas de nanoooro como marcadores analíticos.

Una cuarta función puede ser la posibilidad de alterar las propiedades físicas de las partículas del vector, por ejemplo, mediante el acoplamiento magnético de compañeros de acoplamiento a las partículas del vector y usando las nuevas propiedades físicas como el magnetismo para, por ejemplo, procedimientos de transducción física o procedimientos de purificación basados en las propiedades físicas conferidas por el compañero de acoplamiento en particular.

Una quinta función puede ser la posibilidad de alterar las propiedades bioquímicas de las partículas del vector aparte de su unión al receptor, es decir, conferir actividades enzimáticas a la partícula del vector mediante el acoplamiento de enzimas o de fragmentos catalíticamente activos de enzimas como recombinasas o proteasas de ADN en las partículas del vector, y transportar estas actividades enzimáticas o catalíticas a las células objetivo.

Un prerrequisito para la modificación relevante de la invención de las partículas del vector es la disponibilidad de residuos de cisteína en dominios expuestos al disolvente de la superficie y/o proteínas de la cápside. Aquí es irrelevante si el virus tiene cubierta o no. Es crucial que mediante la reducción y/o la alquilación/esterificación de los grupos tiol, ninguna de las funciones biológicas del vector se vea afectada, únicamente pueden alterarse las características de unión al receptor y/o de fusión a la membrana.

La modificación de las partículas del vector mediante el acoplamiento específico de ligandos en los grupos tiol que han sido insertados genéticamente en dominios expuestos al disolvente según se describe en este documento, puede conseguirse para todos los vectores víricos. El experto en la materia está familiarizado con la existencia de vectores que se basan en un gran número de diferentes virus. Los virus pueden encontrarse en libros de texto accesibles habitualmente tales como, por ejemplo, Fields, Virology. Actualmente son especialmente interesantes

5 para la terapia génica vectores que están basados en adenovirus, virus adenoasociados (AAV) o retrovirus y lentivirus, y existen en diferentes, con algunos virus como el AAV en muchos tipos y serotipos. Para la modificación relevante para la invención se requiere que los grupos tiol que se han insertado genéticamente en dominios expuestos al disolvente de las proteínas de la cápside y/o que están disponibles de forma natural, se mantengan en un estado reducido y reactivo con reactivos reductores suaves, y/o mediante los anteriormente mencionados sistemas tamponantes, o que sean transferidos en este estado.

Las respectivas regiones adecuadas para el acoplamiento específico de tiol están posicionadas en los dominios expuestos al disolvente de las proteínas de la cápside vírica, de forma que pueda realizarse el acoplamiento de los compañeros de acoplamiento.

10 Algunos ejemplos de sitios de fijación adicionales para la inserción genética en ciertos *loci* de las proteínas de la cápside del adenovirus del tipo 5 se enumeran en la siguiente tabla:

Proteína	Locus	Sitio de inserción
base Pentona	M22141, nt 435-2150 ID de la proteína: AAA42519.1	Sustitución de la secuencia AA: HAIRGDTFAT
pIX/C Terminal	AY339865, nt 3609-4031 ID de la proteína: AAQ19289.1	Fijado al C terminal de la secuencia AA: SSPNAV
Hexona/bucle L1	AY339865, nt 18842-21700 ID de la proteína: AAQ19298.1	Sustitución de la secuencia wt-AA-: TIEAAAGNGDNL

15 Las partículas del vector adenovírico modificadas según la presente invención pueden aplicarse especialmente para propósitos terapéuticos para la terapia génica o para la vacunación, o para un análisis funcional y diagnóstico *in vivo* en seres humanos, primates u otros vertebrados como ganado, cerdos, aves, peces o roedores, o *in vitro* en cultivos tisulares o celulares que comprenden células de vertebrados, en particular de seres humanos y primates como ganado, cerdos, aves, peces o roedores. Pueden heredarse alteraciones, alteraciones que están causadas, por ejemplo, por una mutación en un gen. Además, las partículas de vectores adenovíricos modificadas según la presente invención pueden usarse para el tratamiento de alteraciones adquiridas tales como, por ejemplo, enfermedades tumorales o alteraciones del sistema nervioso central tales como el síndrome de Parkinson. En estas situaciones, es decir, en alteraciones genéticas o en alteraciones adquiridas, las partículas de vectores adenovíricos modificadas según la invención y portadoras de uno o más ácidos nucleicos se usan para permitir una transducción mejorada y/o selectiva de células *in vitro* e *in vivo*, con objeto de permitir la expresión de uno o más ácidos nucleicos terapéuticos en estas células. El experto en la materia está familiarizado con el uso de vectores víricos para el tratamiento de alteraciones genéticas o adquiridas, y pueden consultarse libros de texto y publicaciones para la selección de ácidos nucleicos específicos para el tratamiento de alteraciones genéticas o adquiridas. El experto en la materia está familiarizado con las formas de administrar partículas de vectores víricos modificadas a individuos/animales, tales como, por ejemplo, mediante su administración por vía sistémica (por vía intravenosa, intraarterial), mediante su administración a través de orificios corporales o mediante una inyección local o una inyección con catéter en un tejido u órgano. Adicionalmente, las partículas de vectores adenovíricos modificadas relevantes para la invención también pueden aplicarse como vacunas, por ejemplo, para la vacunación profiláctica frente al VIH u otras enfermedades infecciosas, o como vacuna tumoral. De hecho, el uso de partículas víricas modificadas para la vacunación profiláctica o terapéutica frente a infecciones o alteraciones neoplásicas es una aplicación preferida. Entre la comunidad científica se conoce bien que el uso de vectores víricos para la vacunación está frecuentemente alterado o incluso impedido por una inmunidad preexistente mediada por linfocitos B o T que está dirigida contra el vector en particular que se usa para administrar el gen en particular. También, incluso si en un individuo no hay anticuerpos preexistentes contra el vector vírico que se usa para la vacunación, tras una primera aplicación del vector, habitualmente se desencadena una fuerte respuesta inmunitaria que impide una segunda administración del mismo vector vírico.

40 La presente invención permite estrategias para sortear estos problemas mediante el acoplamiento específico de tiol de reactivos protectores tales como polietilenglicol o de ligandos de marcaje, o de ambos, a la superficie de la partícula del vector vírico, evitando así el reconocimiento de estructuras de la superficie del vector vírico por parte del sistema inmunitario, y marcando al mismo tiempo el vector para las células y/u órganos de interés.

45 Los transgenes que pueden ser expresados por el genoma de la partícula del vector son críticos para la invención. Aquí puede tratarse, por ejemplo, de proteínas musculares, factores de coagulación, proteínas de membrana o proteínas reguladoras del ciclo celular. Un ejemplo de una proteína muscular es la distrofina, un ejemplo de una proteína secretada es el factor de coagulación VIII, un ejemplo de una proteína de membrana es la proteína reguladora transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). Además, puede tratarse de genes que se originan en patógenos tales como, por ejemplo, el virus VIH del SIDA o virus o parásitos animales, y están siendo expresados por la partícula del vector vírico como una vacuna.

50 El uso de las partículas de vectores adenovíricos modificados relevantes para la invención puede producirse *in vitro*

o *in vivo*. La transferencia génica *in vitro* se produce fuera del cuerpo, por ejemplo, añadiendo partículas del vector a un tejido o a las células de un cultivo celular. En la transferencia génica *in vivo*, las partículas se están aplicando de formas diferentes, dependiendo del tejido que va a ser transducido. Algunos ejemplos de las formas en las que las partículas del vector pueden aplicarse son inyección en el sistema de vasos arteriales o venosos, inyección directa en el tejido apropiado (por ejemplo, pulmón, hígado, cerebro, músculo), instilación en el órgano apropiado (por ejemplo, pulmón o tracto gastrointestinal) o aplicación directa en una superficie (por ejemplo, piel o vejiga). Las partículas del vector usadas para este propósito están modificadas químicamente con, por ejemplo, el ligando o el polímero protector mediante un acoplamiento específico de tiol del ligando en la superficie de la partícula del vector, de una forma tal que permite la interacción específica del ligando con su receptor objetivo y la subsiguiente captación de la partícula.

La base de este procedimiento es la combinación relevante para la invención de modificaciones genéticas químicas de un dominio expuesto al disolvente de una proteína de la cápside de vectores adenovíricos, mediante lo que la modificación química se produce por la formación de enlaces covalentes y opcionalmente biorreversibles. Un aspecto central del procedimiento es mantener la integridad y las funciones biológicas naturales mediadas por las proteínas del núcleo y de la cápside de las partículas del vector modificadas; sólo deben alterarse las características de unión al receptor/características de fusión a la membrana. Las ventajas básicas se resumen como sigue: (i) producción de partículas de vectores para la modificación química de la cápside con procedimientos convencionales con altos rendimientos (ii) elevada flexibilidad con el uso de compañeros de acoplamiento, protección de la partícula, marcaje o aportación de nuevas características físicas o bioquímicas/catalíticas (iii) elevada especificidad de las modificaciones químicas de la cápside con una biorreversibilidad opcional.

También es ventajoso 1) la inserción genética selectiva de grupos tiol reactivos en la superficie de la cápside antes de la modificación química de las partículas del vector, (2) el potencial curso de secuencias para la modificación genética de las cápsides del vector sin características de unión al receptor conocidas, (3) las modificaciones químicas covalentes y opcionalmente biorreversibles post-produccionales, de al menos una parte de las cisteínas introducidas genéticamente, (4) la posibilidad de un acoplamiento covalente, y por lo tanto, estable, (5) el uso de secuencias para las modificaciones genéticas como base para la modificación química para la cual no hay una función natural descrita, (6) el uso de procedimientos que pueden usar específica y únicamente los grupos tiol reactivos introducidos genéticamente sin modificar covalentemente ningún aminoácido natural existente, (7) el uso de procedimientos que modifican específicamente el estado oxidativo de las partículas del vector (8) la evitación de la reticulación con la cápside a través de la elevada especificidad de las reacciones químicas usadas, (9) la posibilidad de la formación de enlaces (disulfuro) biorreversibles, es decir, reversibles en el medio reductor del endosoma o del citosol, (10) el uso de grupos reactivos pequeños (por ejemplo, maleinimidas) para la modificación química de las partículas del vector mediante la formación de enlaces covalentes, (11) la posibilidad de usar compañeros de acoplamiento no peptídicos /no proteicos, (12) la posibilidad de proteger las partículas del vector mediante la elección de los compañeros de acoplamiento apropiados.

Para la invención es esencial que con el presente procedimiento para la modificación de las partículas del vector para la transferencia génica se mantengan completamente las funciones biológicas naturales mediadas por proteínas de la cápside y del núcleo; sólo pueden alterarse las características de unión al receptor y/o de fusión a la membrana.

La posibilidad de usar grupos tiol de residuos de cisteína que habían sido introducidos genéticamente en la partícula del vector para la modificación química de las partículas del vector modificando su estado oxidativo y manteniendo su integridad y función era inesperada y sorprendente por las siguientes razones: los procedimientos relevantes para la invención permiten la aplicación de reactivos reductores con la subsiguiente alquilación de los grupos tiol reducidos para la modificación química específica de los residuos de cisteína expuestos al disolvente de las partículas del vector modificadas genéticamente. Sorprendentemente, los inventores de la presente solicitud no pudieron observar la alquilación de la proteasa de cisteína vírica p23 de Ad5 ni en las partículas del vector con residuos de cisteína que fueron introducidos genéticamente en las proteínas de la cápside ni en las partículas de vector no modificadas genéticamente tras una reducción química y alquilación con partículas de nanooro monomaleimida. Además, no se detectaron cambios en la infectividad de las partículas habían sido reducidas y subsiguientemente tratadas con reactivos alquilantes en comparación con las partículas de control no tratadas. Según el presente estándar de conocimientos, se habría esperado que después de aplicar reactivos reductores y reactivos alquilantes se habrían alquilado no sólo los tioles expuestos al disolvente que fueron insertados genéticamente, sino adicionalmente también los tioles existentes de forma natural presentes en las proteínas de la cápside Hexona, base Pentona y Fibra, así como pV de la proteína del núcleo. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que tras la reducción de las partículas del vector adenovírico sin modificaciones genéticas, ninguna de estas proteínas era alquilada por las partículas de nanooro monomaleimida. Sin embargo, los residuos de cisteína introducidos genéticamente expuestos al disolvente pudieron ser alquilados con el mismo eficazmente y altamente específico. La alquilación selectiva y específica de los residuos de cisteína insertados genéticamente es una de las labores centrales del procedimiento aquí descrito. Los siguientes ejemplos explican la invención y no deberían considerarse como restrictivos. Si no se menciona de otro modo, se usaron procedimientos estándar de biología molecular, tales como los descritos por Sambrook y col., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.

1. Producción de plásmidos pAd1Cys, pAd3Cys, pAd5Cys

Los plásmidos pAd1Cys, pAd3Cys, pAd5Cys son plásmidos infecciosos de vectores de primera generación que codifican para partículas de vectores adenovíricos que expresan EGFP delecionados en E1. Su producción se lleva a cabo en varias etapas que se describen como sigue.

5 a) Producción de pFKG

El pFKG está basado en el pEGFP-N1 (Clontech) y contiene un casete de expresión para el gen EGFP bajo el control del promotor del CMV humano. Para las subsiguientes etapas de clonación, fue necesario delecionar un sitio de restricción *BstBI* del casete de expresión con la formación del plásmido pFKG. Para esto se digirieron 10 µg de pEGFP-N1 (Clontech) 3 h a 37°C con 100 U de endonucleasa de restricción *SaI* en un volumen total de 100 µl de tampón de restricción A (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 1 mM, pH 7,9). El ADN de la digestión se precipitó con etanol, se lavó durante 5 min a temperatura ambiente con etanol al 70% y se resuspendió en 95 µl de tampón de restricción B (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 1 mM, pH 7,9). Se pipetearon 100 U de la endonucleasa de restricción *XhoI* en un volumen de 5 µl en la disolución y se incubaron 37°C durante 3 h. Esto fue seguido por una extracción de la disolución con fenol/cloroformo, una precipitación con etanol, y el ADN se resuspendió en 50 µ de Tris-HCl (Tris 10 mM, pH 7,5). Se disolvieron 100 ng del ADN con 400 U de ligasa T4 de ADN en un volumen total de 10 µl de tampón de ligación (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 10 mM, ATP 1 mM, 25 µg/ml de albúmina sérica bovina) y se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente. Se transformaron XL2-blue de *Escherichia coli* competentes en transformación (Stratagene) con 1 µl de esta disolución y se incubaron durante 14 h en placas de agar a 37°C. La preparación del ADN a partir de los clones se llevó a cabo con procedimientos estándar (Sambrook y col., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

b) Producción de pGS 109

El pGS109 es un plásmido del vector Ad infeccioso de primera generación que codifica para partículas de adenovirus delecionadas en E1 y que portan el casete de expresión para EGFP de pFKG. Para la clonación del casete de expresión para EGFP de pFKG se usó el sitio único Pac I de pGS66 (Schiedner, 2000). Para esto se digirieron 10 µg de pGS66 con 100 U de tampón de endonucleasa de restricción Pac I en 100 µl de volumen total en tampón de restricción C durante 3 h a 37°C (Bis-Tris-Propan-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 1 mM, pH 7,9). La disolución se extrajo con fenol/cloroformo, el ADN se precipitó con etanol, se resuspendió en 95 µl de tampón de polimerasa (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 1 mM, dATP 50 µM, dTTP 50 µM, dCTP 50 µM, dGTP 50 µM, pH 7,9). Se añadieron 15 U de polimerasa de ADN T4 a la disolución en un volumen total de 5 µl y la disolución se incubó durante 15 min a 12°C. Subsiguientemente se llevaron a cabo una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con etanol. El ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 99 µl de tampón de restricción C. Se añadieron 10 U de CIP y se incubaron durante 1 h a 37°C. Subsiguientemente se llevaron a cabo una extracción con fenol/cloroformo y una precipitación con etanol. El ADN se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 40 µl de Tris-HCl pH 7,9. Este ADN se denominó en lo sucesivo pGS66-Pac. Con objeto de clonar el casete de expresión para EGFP de pFKG en el sitio *PacI* con extremos romos, se digirieron 10 µg de pFKG en un volumen total de 100 µl de tampón de restricción D (NaCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotritol 1 mM, pH 7,9) con 50 U de *AflIII* durante 5 h a 37°C y subsiguientemente se precipitaron con etanol y se resuspendieron en 95 µl de tampón de restricción B. Se añadieron 100 U de *AflIII* al ADN (volumen total de la reacción: 100 l) y se digirieron durante 3 h a 37°C. Se añadieron dATP, dTTP, dCTP, dGTP a unas concentraciones finales de 33 µM cada uno y se añadieron 10 U de polimerasa de ADN I (Fragmento Klenow). La disolución se incubó durante 20 min a 30°C y los fragmentos de ADN resultantes se separaron mediante electroforesis en gel (gel de agarosa al 1%). El fragmento de *AflIII* que contenía el casete de expresión para EGFP (longitud 1697 pb) se cortó del gel y se purificó mediante el kit de extracción en gel de Qiagen (Qiagen, Hilden), se precipitó con etanol y se resuspendió en 40 µl de Tris-HCl a pH 7,5. Para la ligación de este fragmento en el sitio *Pac I* de extremos romos de pGS66 se disolvieron 25 ng de los fragmentos con 100 ng de pGS66-Pac en un volumen total de 10 µl de tampón de ligación con 400 U de ligasa de ADN T4 y se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente con la formación de pGS109. Se transformaron XL2-blue de *Escherichia coli* competentes en transformación (Stratagene) con 1 µl de esta disolución y se incubaron durante 14 h en placas de agar a 37°C. La preparación del ADN a partir de los clones se llevó a cabo con procedimientos estándar. Sólo se usó el ADN de un clon en las subsiguientes etapas, con lo que la orientación transcripcional del casete de expresión de EGFP en el clon usado subsiguientemente era paralela al promotor tardío principal del genoma del adenovirus.

c) Producción de pGS110

El pGS110 es un plásmido infeccioso de primera generación que codifica para partículas infecciosas de adenovirus, porta el casete de expresión para EGFP de pFKG y permite la inserción de secuencias de oligonucleótidos en el gen de la fibra. El gen de la fibra tiene, después del nt 32665 del adenovirus natural (*Locus* AY339865, gi: 33465857) una inserción con la secuencia TTAATTAAGACTAGTACAAATCGAT, que permitió una simple clonación de inserciones adicionales a través de los sitios de restricción *PacI* y *Clal*. Para la producción se digirieron 10 µg de pGS109 con 50 U de *BstBI* en un volumen total de 100 µl de tampón de restricción E (K-Acetato 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Mg-Acetato 10 mM, ditiotritol 1 mM, pH 7,9) durante 2 h a 65°C. Después de enfriar hasta 37°C se añadieron

50 U de *PmeI* y se digirieron durante 4 h a 37°C. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,8% y el fragmento de 10 kB, que contiene el casete de expresión para EGFP de pFKG, se aisló del gel mediante el kit de extracción en gel de Qiagen (Qiagen, Hilden), se precipitó con etanol y se resuspendió en Tris-HCl 40 µl a pH 7,5. Este fragmento se denominó en lo sucesivo Ad-left-EGFP. Se digirieron 10 µg de pVB4 (Biermann, 2001) con 50 U de *Bst*BI en un volumen total de 100 µl de tampón de restricción E durante 2 h a 65°C. Después de enfriar hasta 37°C se añadieron 50 U de *PmeI* y se digirieron durante 4 h a 37°C. Se añadieron 10 U de CIP y incubaron durante 1 h a 37°C. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,8% y el fragmento de 25 kB se aisló del gel mediante electroelución, se precipitó con etanol y se resuspendió en Tris-HCl 40 µl a pH 7,5. Este fragmento se denominó en lo sucesivo inserción Ad-right-Fiber. Se disolvieron 100 ng del fragmento inserción Ad-right-Fiber y 120 ng del fragmento Ad-left-EGFP en un volumen total de 10 µl de tampón de ligasa con 400 U de ligasa de ADN T4 y se incubaron durante 12 h a temperatura ambiente con la formación de pGS110. Se transformaron XL2-blue de *Escherichia coli* (Stratagene) con 1 µl de esta disolución y se incubaron durante 14 h en placas de agar a 37°C. La preparación del ADN a partir de los clones se llevó a cabo con procedimientos estándar.

#### d) Producción de pAd1Cys

15 Para la producción de pAd1Cys, un plásmido de un vector infeccioso de primera generación que codifica para partículas de vectores adenovíricos delecionadas en E1, que porta un casete de expresión para EGFP y que porta la secuencia de oligonucleótidos 5'-TTAATTGGCGGCGGATGCGGTGGCGGCATCGAT-3' (ID. SEC. N°: 4), que codifica para la secuencia de aminoácidos LIGGGCGGGID insertada después del aminoácido (aa) 543 de la fibra del adenovirus natural (AAQ19310.1)), se digirieron 10 µg de pGS110 en un volumen total de 100 µl de tampón de restricción C con 100 U de *PacI* durante 2 h. El ADN se precipitó con etanol y se resuspendió en 90 µl de tampón de restricción E. Se añadieron 50 U de *ClaI* en un volumen de 10 µl y la mezcla se incubó durante 3 h a 37°C. Se añadieron 10 U de CIP, se incubaron durante 1 h a 37°C, el ADN se sometió a una extracción con fenol/cloroformo, se precipitó con etanol, se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 40 µl de Tris-HCl a pH 7,5. Este ADN se denominó en lo sucesivo GS110-CIP. Se hirvieron 1 µg de los oligodesoxirribonucleótidos 5'-fosforilados producidos sintéticamente 1Cys-seq (5'-TGGCGGCGGATGCGGTGGCGGCAT-3') (ID. SEC. N°: 7) así como 1Cys-rev (5'-CGATGCCGCCACCGCATC-CGCCGCAAT-3') (ID. SEC. N°: 8) en 40 µl de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM durante 5 min en un baño de agua y se enfriaron lentamente hasta la temperatura ambiente. El ADN bicatenario así formado se denominó en lo sucesivo Oligo1Cys. Se ligaron 100 ng de GS110-CIP en un total de 10 µl de tampón de ligación con 1 ng de Oligo1Cys y 400 U de ligasa de ADN T4 con la formación de pAd1Cys. Se transformaron XL2-blue de *Escherichia coli* (Stratagene) competentes con 1 µl de esta disolución y se incubaron durante 14 h en placas de agar a 37°C. La preparación del ADN a partir de los clones se llevó a cabo con procedimientos estándar.

#### e) Producción de pAd3Cys

35 La producción de pAd3Cys, un plásmido de un vector infeccioso de primera generación que codifica para partículas de vectores adenovíricos delecionadas en E1, que porta un casete de expresión para EGFP y la secuencia de oligonucleótidos 5'-TTAATTGGCTGCGGATGCGGTTGCGGCATCGAT-3' (ID. SEC. N°: 5) que codifica para la secuencia de aminoácidos LIGCGCGGID (insertada después del aa 543 de la fibra del adenovirus natural (AAQ19310.1)), se corresponde en sus procedimientos con la producción de pAd1Cys, pero se usaron los oligodesoxirribonucleótidos 5'-fosforilados 3Cys-seq (5'-TGGCTGCGGATGCGGTTGCGGCAT-3') (ID. SEC. N°: 9) y 3Cys-rev (5'-CGATGCCGCAACCGCATCCGCAGCCAAT-3') (ID. SEC. N°: 10) en lugar de 1Cys-seq y 1Cys-rev.

#### 40 f) Producción de pAd5Cys

45 La producción de pAd5Cys, un plásmido de un vector infeccioso de primera generación que codifica para partículas de vectores adenovíricos delecionadas en E1, que porta un casete de expresión para EGFP y la secuencia de oligonucleótidos 5'-TTAATTT-GCTGTTGTTGCTGCATCGAT-3' (ID. SEC. N°: 6), que codifica para la secuencia de aminoácidos LICCCCID (insertada después del aa 543 de la fibra del adenovirus natural (AAQ19310.1)), se corresponde en sus procedimientos con la producción de pAd1Cys, pero se usaron los oligodesoxirribonucleótidos 5'-fosforilados 5Cys-seq (5'-TTGCTGTTGTTGCTGCAT-3') (ID. SEC. N°: 11) y 5Cys-rev (5'-CGATGCAGCAACAACAGCAAAT-3') (ID. SEC. N°: 12) en lugar de 1Cys-seq y 1Cys-rev.

### 2. Producción de partículas de vector

50 Para la producción de las partículas del vector, se linealizaron los plásmidos pAd1Cys, pAd3Cys y pAd5Cys con *Swal* y se transfectaron 4-6 µg de los plásmidos linealizados mediante procedimientos de transfección estándar en células 1-2E+06 N52E6. Estas plásmidos son plásmidos lanzadera adenovíricos infecciosos para la producción de partículas de vector de primera generación delecionadas en E1, que se replican en líneas celulares transcomplementarias de E1 tales como N52E6 y pueden producir partículas del vector. El experto en la materia está familiarizado con los procedimientos para la producción de las correspondientes partículas del vector Ad. Debería mencionarse que los tampones usados para la lisis celular estaban invariablemente saturados con oxígeno atmosférico. La purificación de las partículas del vector se llevó a cabo mediante un gradiente de densidad por etapas en CsCl seguido por dos gradientes de densidad continuos en CsCl.

Tras la observación de agregados macroscópicos en el gradiente por etapas en CsCl con Ad5Cys estos agregados

se retiraron del gradiente, se trataron durante 1 h con DTT 10 mM o TCEP 10 mM o ascorbato 50 mM y se añadieron las mismas concentraciones del mismo reactivo reductor al subsiguiente gradiente de densidad continuo de CsCl. Alternativamente, para Ad5Cys, el tampón en el que las células fueron lisadas antes de cargar el gradiente por etapas en CsCl, también se complementó con los anteriormente mencionados reactivos reductores. El experto en la materia está familiarizado con las técnicas de centrifugación en gradiente de densidad continuo y por etapas en CsCl. La desalinización de las partículas del vector después del segundo gradiente por etapas continuo en CsCl se llevó a cabo con tamices moleculares basados en Sephadex G-25. El experto en la materia está familiarizado con estas técnicas de desalinización.

Las partículas del vector se almacenaron en TBS o PBS más un 10% de glicerol a -80°C. Para Ad5Cys se añadieron los reactivos reductores TCEP 10 mM o DTT 10 mM o ascorbato 50 mM. Los rendimientos de las partículas del vector se determinaron tras la purificación y la desalinización con procedimientos estándar con los que está familiarizado el experto en la materia (midiendo la densidad óptica tras la lisis de la partícula, midiendo el contenido en proteínas, midiendo las unidades infecciosas con un ensayo basado en ADN, midiendo el número total de partículas con un ensayo basado en ADN). Aquí pudo apreciarse que, en comparación con las partículas de vector de primera generación no modificadas, la inserción genética de residuos de cisteína en la superficie de la cápside no tuvo efectos negativos relativos a los rendimientos. Las bioactividades invertidas de las preparaciones de las partículas del vector no mostraron diferencias significativas en comparación con las preparaciones de partículas del vector con la cápside sin modificar.

### 3. Medición de los agregados

La identificación de la formación espontánea de agregados en tampones que estaban saturados con oxígeno atmosférico se llevó a cabo con una espectroscopia de correlación fotónica PCS. Se tomó el índice de polidispersidad (PI) de los ensayos individuales como una medida de la existencia de partículas con tamaños ampliamente diferentes, y por lo tanto de la existencia de agregación de partículas. El experto en la materia está familiarizado con este procedimiento. Pudo demostrarse por tanto que las partículas de los vectores Ad1Cys y Ad3Cys formaban espontáneamente agregados pequeños pero solubles (PI: 0,5-1,0, vector de control no modificado: 0,05), que sorprendentemente no interferían con la purificación y las funciones biológicas mediadas por las proteínas del núcleo y de la cápside de la partícula del vector, incluyendo la unión al receptor. Además, también pudo demostrarse que añadiendo reactivos reductores, la formación de los agregados es reversible. La formación controlable y reversible de agregados de partículas sirve como ejemplo del acoplamiento biorreversible, es decir, reversible en las condiciones reductoras del endosoma/citosol, de las moléculas a través de puentes de disulfuro.

### 4. Medición de las funciones biológicas mediadas por las proteínas del núcleo y de la cápside de partículas de vectores modificadas, oxidadas y reducidas.

Se verificó la función biológica de las partículas del vector en el sentido de una eficiente transferencia génica en experimentos de transducción con células A549 y análisis basados en citometría de flujo de la expresión transgénica (EGFP). Aquí pudo demostrarse que tanto con como sin la aplicación de reactivos reductores, las funciones biológicas mediadas por las proteínas del núcleo y de la cápside de las partículas del vector no estaban inhibidas. Tras una reducción con diferentes reactivos reductores (TCEP 10 mM, DTT 10 mM, ascorbato 50 mM), las partículas del vector modificadas eran capaces de transducir la mencionada línea celular con la misma eficacia de las partículas del vector de control sin tratar modificadas y no modificadas.

### 5. Marcaje con oro

A alquilados específicos de tiol y mediados por maleimida las partículas del vector modificadas genéticamente el mismo número de partículas de las diferentes preparaciones de partículas del vector (Ad1Cys Ad3Cys, Ad5Cys, partículas de vector de control no modificadas) se incubó con un exceso molar de 100 veces de partículas de nanooro monomaleimida (Sondas Moleculares) durante 24h a 4°C con y sin la adición de TCEP 10 mM. La reacción se detuvo mediante la adición de cisteína 1 µmol. El análisis del acoplamiento se llevó a cabo mediante SDS-PAGE seminatural con la subsiguiente tinción de plata específica para oro. Aquí fue inesperado y muy sorprendente observar que el acoplamiento del oro se producía sólo con las proteínas de fibra modificadas genéticamente y no con la proteasa vírica p23, la proteína del núcleo V o las proteínas de la cápside Hexona o base Pentona. Este acoplamiento específico se corresponde con las bandas a 270 kDa. Este tamaño se pone junto con el de los trímeros de fibra (aprox. 200 kDa) más tres partículas de oro por trímero de fibra (conjuntamente aprox. 70 kDa). Después de la purificación de la partícula del vector, sorprendentemente pudo observarse también especificidad para la región de los pesos moleculares pequeños. Además, fue sorprendente observar que incluso sin la aplicación de reactivos reductores, las preparaciones de partículas del vector Ad1Cys y Ad3Cys mostraron grupos tioles reducidos expuestos al disolvente que eran accesibles para una alquilación eficiente (hasta tres partículas de oro por trímero de fibra).

### 6. Acoplamiento de transferrina sobre partículas del vector Ad1Cys no reducidas como ejemplo de una alquilación específica con efecto de marcaje

Para modificar específicamente los grupos tiol introducidos genéticamente en la superficie de la partícula del vector

Ad1Cys mediante una alquilación mediada por maleimida con derivados de transferrina, se incubó 1 mg de apotransferrina con 0,021 mg de N-hidroxisuccinimid-polietilenglicol-3400-maleimida en un volumen total 200 µl de PBS desgasificado y subsiguientemente saturado con argón durante 4 h a temperatura ambiente. Se añadió un µl de esta reacción a partículas del vector 1E+011 Ad1Cys en un volumen de 80 µl de PBS/10% de glicerol. Esta reacción de alquilación se incubó en una atmósfera de argón durante 20 h a temperatura ambiente. Tras la alquilación, se usó la preparación de partículas del vector modificadas para transducir células 5E+05 K562 con cifras de partículas crecientes de 100, 1000 y 5000 partículas por célula. Inmediatamente antes de la transducción se añadieron 3 µl de una disolución de citrato de Fe(III) 1 mM por 350 µl medio de cultivo celular, con objeto de reconstituir la transferrina que se había acoplado a las partículas del vector. Como controles se usaron las mismas cifras de partículas del vector no alquiladas y partículas no alquiladas mezcladas con transferrina libre, así como las mismas cifras de partículas de un vector con la cápside no modificada. Se determinó el número de células que expresaban EGFP mediante citometría de flujo 30 h después de la transducción. La Tabla 1 aporta una visión global del porcentaje de células positivas en EGFP en los experimentos individuales. Se enumeran las medias de 4 experimentos independientes. Los datos demuestran que los autores tuvieron sorprendentemente éxito para alquilar las cisteínas libres sobre la superficie de las partículas del vector mediante la transferrina modificada con maleimida incluso sin reducción e incluso después de identificar pequeños agregados de partículas del vector mediante espectroscopia de correlación fotónica. Además, mediante esta reacción de alquilación específica se alteraron con éxito las características de unión al receptor de las partículas. Esto no era obvio a partir de los datos publicados.

Tabla 1:

<b>Partículas del vector</b>	<b>100 partículas/célula</b>	<b>1000 partículas/célula</b>	<b>5000 partículas/célula</b>
Partículas libres de vector de control no modificadas sin Tf	11,87%	45,49%	79,65%
Ad1Cys libre sin Tf	9,17%	47,42%	83,02%
Ad1Cys libre con Tf libres	9,30%	47,47%	83,51%
Ad1Cys con Tf acoplada por maleimida	46,73%	90,49%	94,42%

7. Ejemplo de una alquilación tras la reducción: el acoplamiento de transferrina a partículas reducidas del vector Ad5Cys no interfiere con la infectividad de la partícula del vector

Se usó el mismo procedimiento según se describió anteriormente para alquilar con transferrina partículas del vector 1E+010 Ad5Cys que habían sido reducidas con TCEP 10 mM. Se transdujeron K562 y 36 h después de la transducción las células se analizaron mediante citometría de flujo. La Tabla 2 muestra los resultados (medias de 2 experimentos independientes). Esto muestra sorprendentemente que tras la reducción y la alquilación no se produce pérdida en la infectividad de las partículas del vector. Esto se correlaciona bien con los resultados de los experimentos de marcaje con oro que no mostraron alquilación de la proteasa vírica. No pudo observarse un efecto de marcaje significativo en este experimento porque en condiciones reductoras la transferrina se redujo y no fue capaz de unir el hierro, y por lo tanto perdió su capacidad de unirse al receptor de transferrina

Tabla 2:

<b>Partículas del vector</b>	<b>100 partículas/célula</b>	<b>1000 partículas/célula</b>	<b>5000 partículas/célula</b>
Ad5Cys reducido, sin Tf	3,88%	32,29%	63,91%
Ad5Cys reducido, con Tf libre	5,78%	42,75%	75,33%

8. Ejemplo de modificación química específica de grupos tiol introducidos genéticamente tras la modificación de la superficie de las partículas del vector mediante PEGilación con un derivado de PEG activado electrofílicamente reactivo con aminas.

Para la aminoPEGilación, se usó mPEG2000-SPA (Nektar Therapeutics). A partículas físicas 5E+010 de Ad1Cys en un volumen total de 100 µl de tampón HEPES 50 mM burbujeado con argón, pH 7,3, se añadieron 0,3 mg de mPEG2000-SPA y se hicieron reaccionar en argón durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se extinguió mediante la adición de un exceso de 1,5 veces de lisina libre sobre moléculas de mPEG-SPA reactivas y la incubación a temperatura ambiente durante 2 h en una atmósfera de argón. Finalmente, para fijar la transferrina a los tioles de las partículas del vector PEGiladas, se añadió transferrina modificada con NHS-PEG3400-Mal en un exceso molar de 5 veces sobre los residuos de cisteína y se hizo reaccionar hasta el día siguiente en argón (véase el ejemplo 6). Tras un día de reacción, las partículas se usaron para transducir células K562 de la misma forma según se describe en el ejemplo 6 y 24 h después se determinó el número de células que expresaban EGFP mediante citometría de flujo. La Figura 2 muestra un resultado típico para un vector no modificado químicamente (Ad1Cys), un vector aminoPEGilado sin modificación específica de tiol ("Ad1Cys + SPA-PEG") y un vector aminoPEGilado y subsiguientemente modificado en tiol portador de transferrina fijada covalentemente a los grupos tiol introducidos genéticamente ("Ad1Cys + SPA-PEG + Tf-Mal"). El vector aminoPEGilado mostró una eficacia de transducción significativamente reducida en comparación con el vector Ad1Cys no modificado. Sorprendentemente, tras la modificación adicional del vector aminoPEGilado con maleimida-transferrina reactiva frente a tiol (véase el

ejemplo 6), las partículas del vector mostraron un incremento significativo en la eficacia de transducción en células K562. Esto demuestra que 1) tras la aminoPEGilación con un PEG reactivo frente a aminos, los grupos tiol introducidos genéticamente en la superficie de las partículas del vector permanecen accesibles para el acoplamiento químico, y 2) que esto puede usarse para el remarcado de dichas partículas de vector PEGiladas portadoras de tiol en la vía del receptor de transferrina mediante el acoplamiento químico de transferrina a la superficie de la partícula del vector. Fue inesperado y muy sorprendente que los grupos tiol permanecieran accesibles para la modificación química con compañeros de acoplamiento grandes como la transferrina tras la modificación de la superficie de las partículas del vector con un reactivo protector como mPEG-SPA2000.

### Referencias

10 Las siguientes referencias, hasta el grado en que proporcionan procedimientos ejemplares u otros detalles complementarios a los establecidos en este documento, se incorporan específicamente al presente documento como referencia:

Biermann V, Volpers C, Hussmann S, Stock A, Kewes H, Schiedner G, Herrmann A, Kochanek S. Targeting of high-capacity adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 12: 1757-69 (2001).

15 Dmitriev I, Krasnykh V, Miller CR, Wang M, Kashentseva E, Mikheeva G, Belousova N, Curiel DT. An adenovirus vector with genetically modified Fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol.* 72: 9706-13 (1998).

Fields y col., *Fields Virology*, 3ª edición, Lippincott-Raven Publishers Filadelfia, Filadelfia (1996).

20 Fisher KD, Stallwood Y, Green NK, Ulbrich K, Mautner V, Seymour LW. Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther.* 8: 341-8 (2001).

Greber UF, Webster P, Weber J, Helenius A. The role of adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J.* 15: 1766-77 (1996).

Jörnvall H, Philipson L. Limited proteolysis and a reactive cysteine residue define accessible regions in the native conformation of the adenovirus hexon protein. *Eur J Biochem.* 104: 237-47 (1980).

25 Schiedner G, Hertel S, Kochanek S. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther.* 11: 2105-16 (2000).

Stubenrauch K, Gleiter S, Brinkmann U, Rudolph R, Lilie H. Conjugation of an antibody Fv fragment to a virus coat protein: cell-specific targeting of recombinant polyoma-virus-like particles. *Biochem J.* 356: 867-73 (2001).

30 Wang Q, Lin T, Johnson JE, Finn MG. Natural supramolecular building blocks. Cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol.* 9: 813-9 (2002).

Wigand y col., en: *Adenovirus DNA*, Doerfler, Ed., Martinus Nijhoff Publishing, Boston, págs. 408-441 (1986).

### LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Kochanek, Stefan Kreppel, Florian

<120> Partículas modificadas de vectores víricos

<130> KOC-001 PCT

40 <140> desconocido

<141> 2005-05-02

<150> DE 10 2004 021 584.7

<151> 2004-05-03

45

<150> US 60/601 902

<151> 2004-08-16

<160> 15

50 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

ES 2 390 276 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sitio de fijación

5

<400> 1

Leu Ile Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ile Asp  
1 5 10

<210> 2

<211> 11

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sitio de fijación

15

<400> 2

Leu Ile Gly Cys Gly Cys Gly Cys Gly Ile Asp  
1 5 10

<210> 3

<211> 9

20

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sitio de fijación

25

<400> 3

Leu Ile Cys Cys Cys Cys Cys Ile Asp  
1 5

<210> 4

<211> 33

30

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia codificante para el sitio de fijación

35

<400> 4

ttaattggcg gcggatgctg tggcggcatc gat 33

<210> 5

<211> 33

40

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

45

<223> secuencia codificante para el sitio de fijación

<400> 5

ttaattggct gcggatgctg tggcggcatc gat 33

<210> 6

<211> 27

50

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

55

<223> secuencia codificante para el sitio de fijación

<400> 6  
 ttaattgct gttgtgctg catcgat 27

5 <210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 7  
 tggcggcggg tgcggtggcg gcat 24

15 <210> 8  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 8  
 25 cgatgccgcc accgcatccg ccgccaat 28

<210> 9  
 <211> 24  
 30 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

35 <400> 9  
 tggctgcgga tgcggtgctg gcat 24

40 <210> 10  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador

<400> 10  
 50 cgatgccgca accgcatccg cagccaat 28

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 55 <213> secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador

60 <400> 11  
 ttgctgtgt tgctgcat 18

<210> 12  
 <211> 22  
 65 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

# ES 2 390 276 T3

<220>  
<223> Cebador

5 <400> 12  
cgatgcagca acaacagcaa at 22

10 <210> 13  
<211> 592  
<212> PRT  
<213> secuencia artificial

15 <220>  
<223> Ad1Cys de fibra

<400> 13

ES 2 390 276 T3

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro  
1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro  
20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser  
35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu  
50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser  
65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn  
85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu  
100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr  
115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile  
130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln  
145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr  
165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu  
180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly  
195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr  
210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr  
225 230 235 240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala  
245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val  
260 265 270

ES 2 390 276 T3

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln  
 275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn  
 290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu  
 305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile  
 325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro  
 340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp  
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp  
 370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr  
 385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu  
 405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile  
 420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile  
 435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn  
 450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe  
 465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly  
 485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala  
 500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys  
 515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Leu  
 530 535 540

Ile Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ile Asp Asp Thr Thr Pro Ser Ala  
 545 550 555 560

Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly His Asn Tyr Ile Asn  
 565 570 575

Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu  
 580 585 590

ES 2 390 276 T3

<211> 592  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Ad3Cys de fibra

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro  
 1 5 10 15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro  
 20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser  
 35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu  
 50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser  
 65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn  
 85 90 95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu  
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr  
 115 120 125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile  
 130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln  
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr  
 165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu  
 180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly  
 195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr  
 210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr  
 225 230 235 240

ES 2 390 276 T3

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala  
 245 250 255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val  
 260 265 270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln  
 275 280 285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn  
 290 295 300

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu  
 305 310 315 320

Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile  
 325 330 335

Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro  
 340 345 350

Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp  
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp  
 370 375 380

Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr  
 385 390 395 400

Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu  
 405 410 415

Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile  
 420 425 430

Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile  
 435 440 445

Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn  
 450 455 460

Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe  
 465 470 475 480

Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly  
 485 490 495

Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala  
 500 505 510

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys  
 515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Leu  
 530 535 540

ES 2 390 276 T3

Ile Gly`Cys Gly Cys Gly Cys Gly Ile Asp Asp Thr Thr Pro Ser Ala  
 545 550 555 560  
 Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly His Asn Tyr Ile Asn  
 565 570 575  
 Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu  
 580 585 590

<210> 15  
 <211> 590  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Ad5Cys de fibra

10

<400> 15

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro  
 1 5 10 15  
 Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro  
 20 25 30  
 Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser  
 35 40 45  
 Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu  
 50 55 60  
 Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser  
 65 70 75 80  
 Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn  
 85 90 95  
 Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu  
 100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr  
 115 120 125  
 Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile  
 130 135 140  
 Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln  
 145 150 155 160  
 Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr  
 165 170 175  
 Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu  
 180 185 190  
 Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly

ES 2 390 276 T3

195					200					205					
Ala	Pro	Leu	His	Val	Thr	Asp	Asp	Leu	Asn	Thr	Leu	Thr	Val	Ala	Thr
	210					215					220				
Gly	Pro	Gly	Val	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Thr	Lys	Val	Thr
	225					230					235				240
Gly	Ala	Leu	Gly	Phe	Asp	Ser	Gln	Gly	Asn	Met	Gln	Leu	Asn	Val	Ala
				245					250					255	
Gly	Gly	Leu	Arg	Ile	Asp	Ser	Gln	Asn	Arg	Arg	Leu	Ile	Leu	Asp	Val
			260					265					270		
Ser	Tyr	Pro	Phe	Asp	Ala	Gln	Asn	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln
		275					280						285		
Gly	Pro	Leu	Phe	Ile	Asn	Ser	Ala	His	Asn	Leu	Asp	Ile	Asn	Tyr	Asn
	290					295					300				
Lys	Gly	Leu	Tyr	Leu	Phe	Thr	Ala	Ser	Asn	Asn	Ser	Lys	Lys	Leu	Glu
	305					310					315				320
Val	Asn	Leu	Ser	Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Met	Phe	Asp	Ala	Thr	Ala	Ile
				325					330					335	
Ala	Ile	Asn	Ala	Gly	Asp	Gly	Leu	Glu	Phe	Gly	Ser	Pro	Asn	Ala	Pro
			340					345					350		
Asn	Thr	Asn	Pro	Leu	Lys	Thr	Lys	Ile	Gly	His	Gly	Leu	Glu	Phe	Asp
		355					360						365		
Ser	Asn	Lys	Ala	Met	Val	Pro	Lys	Leu	Gly	Thr	Gly	Leu	Ser	Phe	Asp
	370					375					380				
Ser	Thr	Gly	Ala	Ile	Thr	Val	Gly	Asn	Lys	Asn	Asn	Asp	Lys	Leu	Thr
	385					390					395				400
Leu	Trp	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Asn	Cys	Arg	Leu	Asn	Ala	Glu
				405					410					415	
Lys	Asp	Ala	Lys	Leu	Thr	Leu	Val	Leu	Thr	Lys	Cys	Gly	Ser	Gln	Ile
			420					425					430		
Leu	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Leu	Ala	Val	Lys	Gly	Ser	Leu	Ala	Pro	Ile
		435					440					445			
Ser	Gly	Thr	Val	Gln	Ser	Ala	His	Leu	Ile	Ile	Arg	Phe	Asp	Glu	Asn
	450					455					460				
Gly	Val	Leu	Leu	Asn	Asn	Ser	Phe	Leu	Asp	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asn	Phe
	465					470					475				480
Arg	Asn	Gly	Asp	Leu	Thr	Glu	Gly	Thr	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Val	Gly
				485					490					495	
Phe	Met	Pro	Asn	Leu	Ser	Ala	Tyr	Pro	Lys	Ser	His	Gly	Lys	Thr	Ala
			500					505					510		

ES 2 390 276 T3

Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys  
515 520 525

Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Leu  
530 535 540

Ile Cys Cys Cys Cys Cys Ile Asp Asp Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser  
545 550 555 560

Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile  
565 570 575

Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser Tyr Ile Ala Gln Glu  
580 585 590

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la generación de una partícula de un vector adenovírico, que comprende las etapas:
  - a) generación de una partícula de un vector adenovírico en líneas celulares de empaquetamiento que comprenden proteínas de la cápside, comprendiendo dichas proteínas de la cápside un sitio de fijación para la modificación específica de la partícula del vector adenovírico, comprendiendo dicho sitio de fijación al menos un residuo de cisteína que está ubicado en un dominio expuesto al disolvente de dicha proteína de la cápside;
  - b) lisado de las células de empaquetamiento y la subsiguiente purificación de dichas partículas de vectores adenovíricos en tampones con un pH desde 5,0 hasta 9,0 y exentos de cationes metálicos divalentes, en el que dicho tampón es
    - (i) un tampón con poco oxígeno o sin oxígeno en una atmósfera de Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>, o
    - (ii) un tampón con poco oxígeno o sin oxígeno complementado con reactivos reductores en una atmósfera de Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>;
  - c) poner en contacto los compañeros de acoplamiento con dichas partículas de vectores adenovíricos y realizar una reacción de acoplamiento de los compañeros de acoplamiento a los residuos de cisteína a través de enlaces tioéter, disulfuro o tioéster mediante la adición de reactivos alquilantes que comprenden grupos maleimida, grupos ditiopiridilo o grupos yodoacetilo en un tampón con un pH desde 5,0 hasta 9,0 y exento de cationes metálicos divalentes, en el que dicho tampón es
    - (i) un tampón que comprende reactivos reductores, o
    - (ii) un tampón con poco oxígeno o sin oxígeno complementado con reactivos reductores en una atmósfera de Ar, He, N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el tampón de la etapa b) y/o de la etapa c) tiene un pH desde 6,8 hasta 7,4.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el tampón de la etapa b) y/o de la etapa c) tiene un pH de 7,3.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los cationes metálicos divalentes son Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup>.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente después de la etapa b) o al mismo tiempo que o después de la etapa c) modificaciones químicas adicionales de las proteínas de la cápside que no implican residuos de cisteína como compañeros de reacción
6. Partícula de vector adenovírico que comprende proteínas de la cápside, en la que dichas proteínas de la cápside comprenden al menos un residuo de cisteína como sitio de fijación, que está unido a través de un enlace de disulfuro, tioéter o tioéster a un compañero de acoplamiento y puede obtenerse mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Partícula de vector adenovírico según la reivindicación 6, en el que las proteínas de la cápside están modificadas químicamente mediante reacciones químicas que no implican grupos tiol como compañeros de reacción para la reacción de modificación.
8. Partícula de vector adenovírico según la reivindicación 6 ó 7, que comprende al menos dos compañeros de acoplamiento diferentes.
9. Partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la cual un compañero de acoplamiento tiene uno o más sitios de fijación.
10. Partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la cual dicho(s) compañero(s) de acoplamiento es/son ligandos específicos celulares, polímeros, especialmente derivados de PEG o derivados de HPMA, partículas de nanoo, pigmentos fluorescentes, sustancias magnéticas o sustancias bioquímicamente/catalíticamente activas.
11. Partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la cual dicho sitio de fijación tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más residuos de cisteína, y en la cual dos o más de dichos residuos de cisteína son consecutivos o están separados por 1, 2, 3 o más residuos de aminoácidos que son diferentes de la cisteína.
12. Partícula de vector adenovírico según la reivindicación 11, comprendiendo dicho sitio de fijación los aminoácidos según la ID. SEC. N°: 1, la ID. SEC. N°: 2 o la ID. SEC. N°: 3.
13. Partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la cual las proteínas de la cápside del adenovirus se eligen de entre proteína de fibra, Hexona, base Pentona y proteína IX.

14. Partícula de vector adenovírico según la reivindicación 13, comprendiendo dicha proteína de fibra los aminoácidos según la ID. SEC. N°: 13, la ID. SEC. N°: 14 o la ID. SEC. N°: 15.

15. Uso de dicha partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 como medio diagnóstico en vertebrados, en particular, en seres humanos y primates.

5 16. Partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 para su uso como medio terapéutico o profiláctico en vertebrados, en particular, en seres humanos y primates.

17. Uso de dicha partícula de vector adenovírico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 *in vitro* como un medio terapéutico, profiláctico o diagnóstico en cultivos tisulares o celulares que comprenden células de vertebrados, en particular, de seres humanos y primates.

10

Fig. 1

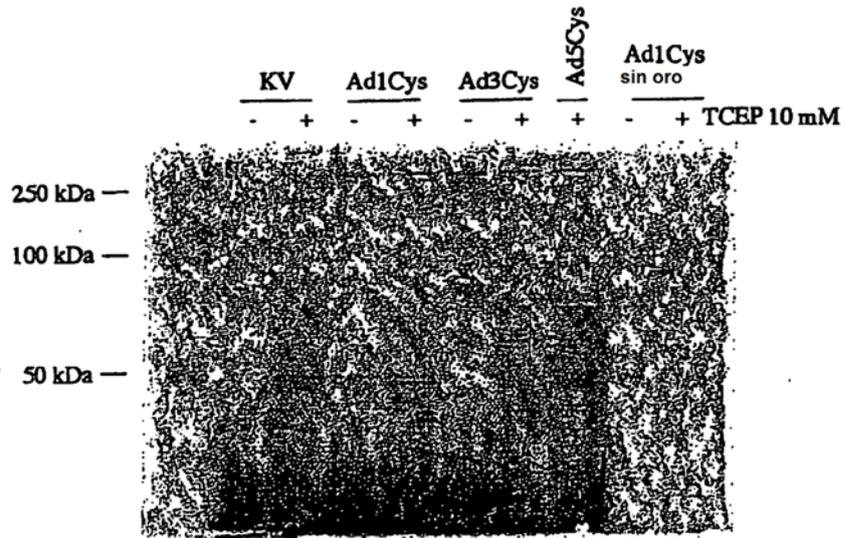


Fig. 2

