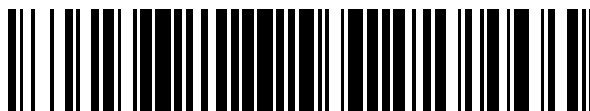


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 975**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 39/235 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04779179 .3**

96 Fecha de presentación: **26.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1649028**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Vacunas a base de vector adenovírico**

30 Prioridad:

25.07.2003 US 490106 P

14.07.2004 US 588000 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

03.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

03.12.2012

73 Titular/es:

GENVEC, INC. (50.0%)
65 WEST WATKINS MILL ROAD
GAITHERSBURG, MARYLAND 20878, US y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH
AND HUMAN SERVICES (50.0%)

72 Inventor/es:

GALL, JASON G., D.;
WICKHAM, THOMAS, J.;
ENRIGHT, WILLIAM, J.;
BROUGH, DOUGLAS, E.;
ZUBER, MOHAMMED;
KING, C., RICHTER;
NABEL, GARY J. y
CHENG, CHENG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 975 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).

DESCRIPCION

Vacunas a base de vector adenovirico

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al uso de un vector adenovirico recombinante en la fabricación de una composición farmacéutica para inducción de una respuesta inmune en un mamífero.

Antecedentes de la invención

10 El suministro de productos terapéuticos a sitios de enfermedad en cantidades biológicamente relevantes ha sido un obstáculo para el desarrollo de fármacos durante décadas. Una solución que ha probado ser una alternativa con éxito a las vías de suministro de fármacos tradicionales es el suministro de secuencias de ácido nucleico exógeno para la producción de factores terapéuticos *in vivo*. Los vectores de transferencia de genes abarcan idealmente una amplia variedad de tipos de células, tienen la capacidad para aceptar grandes secuencias de ácido nucleico, son seguros, y pueden producirse en cantidades requeridas para el tratamiento de pacientes. Los vectores adenoviricos tienen todos ellos estas propiedades ventajosas y se usan en una diversidad de protocolos para tratar o prevenir trastornos biológicos.

15 Sin embargo, el uso indiscriminado de vectores adenoviricos está impedido, al menos en parte, por la inmunogenicidad del vector. Una mayoría de la población de los Estados Unidos de América ha sido expuesta a adenovirus de tipo salvaje y han desarrollado inmunidad pre-existente a vectores de transferencia de genes a base de adenovirus. Como un resultado de ello, los vectores adenoviricos son rápidamente aclarados de la corriente sanguínea, reduciéndose, con ello, la eficacia del vector en el suministro de cantidades biológicamente relevantes de producto de gen. La neutralización y/o aclaramiento de vectores adenoviricos en el cuerpo complica el uso de estos vectores como vacunas de ADN. Las vacunas de ADN usan vectores de transferencia de genes para suministrar ADN que codifica el antígeno a las células huéspedes. Mediante la producción de proteínas antigénicas *in vivo*, las colas mediadas por células y humorales del sistema inmune son activadas, generándose, de esta forma, una respuesta inmune más completa contra el antígeno, en comparación con las vacunas tradicionales en las que son inyectadas dentro del cuerpo proteínas extrañas. A pesar de las características ventajosas de los vectores adenoviricos como vehículos de suministro de genes, la inmunogenicidad del vector evita la dosificación repetida eficaz, lo que puede ser ventajoso para el "reforzamiento" del sistema inmune contra patógenos, y como resultado de ello, en únicamente una pequeña fracción de una dosis de vector adenovirico se suministra su carga completa a las células huéspedes.

20 El uso terapéutico de vectores adenoviricos está igualmente limitado por la estabilidad de los vectores adenoviricos. Por ejemplo, la eliminación de la región E1 del genoma adenovirico del serotipo 5 hace que la deficiente replicación del adenovirus frecuentemente dé como resultado la atenuación de la regulación de la expresión de la proteína cápsida IX (pIX). Aunque la atenuación de la regulación de la pIX no parece inhibir la producción de partículas víricas, los vectores adenoviricos deficientes en pIX se ha mostrado que son termolábiles *in vivo* (véase, por ejemplo, Colby y otros, J. Virol., vol. 39, págs. 977-980, (1981)), y no pueden encapsidar genomas de longitud total (véase, por ejemplo, Ghosh-Choudhury y otros, EMBO J., vol. 6, págs. 1733-1739, (1987), y Caravokyri y otros, J. Virol., vol. 35, págs. 6627-6633, (1995)).

De acuerdo con ello, existe una necesidad en la técnica de constructos de vectores adenoviricos alternativos y procedimientos de uso de dichos constructos, para suministrar secuencias de ácidos nucleicos, particularmente secuencias de ácidos nucleicos que codifiquen antígenos, a las células huéspedes. La invención proporciona dicho vector adenovirico y procedimientos de uso. Estas y otras ventajas de la invención, así como características de la invención adicionales, resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención proporcionada en la presente invención..

Breve resumen de la invención

La invención pertenece al uso de un vector adenovirico del no-subgrupo C de acuerdo con la reivindicación 1.

45 La invención proporciona además el uso de una composición que comprende (a) un vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35 que comprende un genoma adenovirico deficiente en una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1A del genoma adenovirico y la región E1B del genoma adenovirico que codifica la proteína E1B de 55K y (b) un soporte. Además, la invención proporciona un procedimiento de producción de un vector adenovirico. El procedimiento comprende la introducción de un vector adenovirico del serotipo 41 o un vector adenovirico del serotipo 35 que comprende un genoma adenovirico deficiente en una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1A del genoma adenovirico y la región E1B del genoma adenovirico que codifica la proteína E1B de 55K dentro de una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico adenovirico del subgrupo C que codifica la una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1A y la región E1B que son deficientes en el vector adenovirico. La célula comprende además un marco de lectura abierto 6 (ORF6) de una región E4 adenovirica del subgrupo C. La célula no comprende una secuencia de ácido nucleico del no-subgrupo C que codifica la una o más funciones de la región E1A y la región E1B deficientes en el vector adenovirico. El procedimiento comprende además la propagación del vector adenovirico.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que ilustra el título del virus de los vectores adenovíricos Ad35f y Ad35P5 en función del tiempo a 48°C.

5 La Figura 2 es una gráfica que ilustra los resultados del análisis mediante espectroscopia de masas del Ad35 de tipo salvaje y un vector adenovírico Ad35 eliminada la E1.

La Figura 3 es un diagrama que ilustra el genoma de un vector adenovírico Ad35 que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX ligada de manera operable a un promotor AAV p5.

La Figura 4 representa un análisis mediante gel de poliacrilamida teñido con plata de la proteínas codificadas por el Ad35 de tipo salvaje y el vector adenovírico Ad35f.

10 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona materiales y su uso para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero. En particular, la invención proporciona vectores adenovíricos adecuados para el suministro de secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos a células huéspedes y procedimientos de uso de dichos vectores adenovíricos para inducir una respuesta inmune contra uno o más antígenos codificados. En una realización, la invención proporciona el uso de un vector adenovírico para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero, que comprende la administración al mamífero de un vector adenovírico del no-subgrupo C que comprende una proteína de fibra adenovírica que comprende una secuencia de aminoácido que comprende aproximadamente 80% o más de identidad con la secuencia de aminoácido que codifica una proteína de fibra adenovírica del subgrupo C. El vector adenovírico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno que está expresado en el mamífero, para inducir una respuesta inmune.

Pueden usarse adenovirus procedentes de cualquier origen, cualquier subgrupo, mezcla de subgrupos, o cualquier adenovirus quimérico como la fuente del genoma vírico para el vector adenovírico de la invención. Preferiblemente, se usa un adenovirus humano como la fuente del genoma vírico para un vector adenovírico suministrado a pacientes humanos. A este respecto, el adenovirus puede ser del subgrupo C (por ejemplo, serotipos 2 y 5). Sin embargo, en el contexto del procedimiento de la invención, preferiblemente el adenovirus no es un adenovirus del subgrupo C. Por ejemplo, un adenovirus puede ser del subgrupo A (por ejemplo, serotipos 12, 18, y 31), del subgrupo B (por ejemplo, serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, y 50), del subgrupo D (por ejemplo, serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, y 42-48), del subgrupo E (por ejemplo, serotipo 4), del subgrupo F (por ejemplo, serotipos 40 y 41), o de un subgrupo no clasificado (por ejemplo, serotipos 49 y 51). Los serotipos adenovíricos 1 al 51 se encuentran disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Preferiblemente, el vector adenovírico es un vector adenovírico del subgrupo B o del subgrupo F. Más preferiblemente, el vector adenovírico es un vector adenovírico del serotipo 35 o un vector adenovírico del serotipo 41. Los vectores adenovíricos del no-subgrupo C, así como los procedimientos para la producción de vectores adenovíricos del no-subgrupo C, están divulgados, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 5.801.030; 5.837.511; y 5.849.561 y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 97/12986 y WO 98/53087.

Un adenovirus usado como la fuente del genoma vírico para un vector adenovírico no necesita ser un adenovirus humano. Los adenovirus (no humanos) caninos, ovinos, aviáres, bovinos, o simios pueden servir como vectores adenovíricos. Los vectores adenovíricos a base de virus aislados a partir de animales no humanos evitarán igualmente la inmunidad pre-existente, puesto que los pacientes humanos no están de manera natural infectados por estos virus. Los vectores adenovíricos no humanos están descritos adicionalmente en las Patentes de EE.UU. 6.083.716 y 6.479.290 y las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de EE.UU. 2003/009678 A1 y 2003/0108569 A1.

Los adenovirus procedentes de diferentes subgrupos varían en cuanto la reactividad inmunológica, oncogenicidad, y eficacias de transducción para diferentes tipos de células. En general, los adenovirus pueden infectar una amplia diversidad de tipos de células. Sin embargo, en la naturaleza, los adenovirus de diferentes subgrupos pueden infectar diferentes tejidos en el cuerpo, por ejemplo, el intestino frente a tejidos respiratorios. El procedimiento de la invención aprovecha las diferencias de los adenovirus del no subgrupo C en comparación con los adenovirus del subgrupo C comúnmente usados para la transferencia de genes *in vivo* y a los cuales una mayoría de la población tiene inmunidad pre-existente. Los vectores adenovíricos del no subgrupo C no son neutralizados en los mamíferos con inmunidad pre-existente a los vectores adenovíricos del subgrupo C tan rápidamente como los vectores adenovíricos del subgrupo C, lo cual permite un mayor tiempo de circulación e incremento de la eficacia de transducción (Vogels y otros, *Journal of Virology*, vol. 77, (nº. 15), págs. 8263-8271, (2003)). Además, la tropicidad natural de los vectores adenovíricos del no subgrupo C puede facilitar el suministro de antígeno a un tejido diana deseado.

Sin embargo, los vectores adenovíricos del no subgrupo C pueden comprender atributos únicos que les hacen ser no deseables o, como mucho, menos deseables que los vectores adenovíricos del subgrupo C, en el contexto de vacunas de ADN. Por ello, aunque el vector adenovírico del serotipo 35 evade con éxito la inmunidad pre-existente a adenovirus, el vector adenovírico podría atenuar la regulación, bloquear, o fallar en la estimulación de una respuesta

inmune contra un antígeno deseado. La invención busca superar los obstáculos asociados con el uso de los vectores adenoviricos del no subgrupo C como vehiculos de vacunas de ADN.

Los vectores adenoviricos del no subgrupo C incapaces de mediar una respuesta inmune contra un antígeno codificado típicamente difieren de los vectores adenoviricos del subgrupo C en tres aspectos: tropismo para los receptores de superficie de célula, mecanismo de entrada vírica, y genoma. Algunos serotipos de adenovirus usan diferentes receptores de superficie de célula para entrar en las células huéspedes. Por ejemplo, los vectores adenoviricos del subgrupo C del serotipo 5 y serotipo 2 unen los receptores de virus Coxsackie y adenovirus (CAR), los cuales, en combinación con las integrinas de superficie de célula, median en la entrada vírica dentro de la célula huésped. Igualmente, los adenovirus del subgrupo C pueden unir el dominio $\alpha 2$ del complejo-1 de histocompatibilidad principal (MHC I) y los glucosaminoglicanos de sulfato de heparina a través de la región botón y la región tallo de la proteína fibra, respectivamente (véase, por ejemplo, Hong y otros, EMBO J., vol. 16, págs. 2294-2306, (1997), y Dechecchi y otros, J. Virol., vol. 75, págs. 8772-8780, (2002)). Por el contrario, los vectores adenoviricos del subgrupo B2, tales como los vectores adenoviricos del serotipo 35, se unen de manera natural a CD46, una proteína complemento de superficie de célula, para lograr la entrada dentro de las células huéspedes (véase, por ejemplo, Gaggar y otros, Molecular Therapy, vol. 7, (nº 5), resumen 416, (2003)). La unión de bloqueo de un vector adenovirico del no subgrupo C a su receptor de superficie de célula nativo (por ejemplo, una proteína complemento, tal como CD46), puede bloquear la regulación negativa mediada por vector de una reacción inmune. Igualmente, la modificación del mecanismo de entrada vírica, incluyendo, por ejemplo, el uso de un receptor no nativo para entrar en las células, la ablación de la unión nativa y/o el re-direccionamiento del sitio diana del cápsido adenovirico a las moléculas accesorias de superficie de célula que facilitan la unión virus-célula (por ejemplo, las integrinas α_v), y/o la re-designación de vías intracelulares implicadas en el ciclado vírico del núcleo, pueden inhibir, igualmente, la atenuación de la regulación mediada por el vector adenovirico del no subgrupo C, de una reacción inmune de un mamífero hacia una región codificada. Por otra parte, el re-direccionamiento del sitio diana de un cápsido de vector adenovirico del no subgrupo C, el cual no se une a un receptor de superficie de célula para un vector adenovirico de un subgrupo C (por ejemplo, CAR, dominio $\alpha 2$ de MHC I, o glucosaminoglicanos de sulfato de heparina), para entrar en células huéspedes a través de la unión del receptor de superficie de célula del subgrupo C (por ejemplo, mediante la inserción de una secuencia de aminoácido no nativa de unión a CAR dentro de la proteína de fibra, el uso de una molécula bi-específica, y similares), puede inhibir o prevenir la atenuación de la regulación de la respuesta inmune mediada por el vector adenovirico del no subgrupo C o sobre-regular (es decir, potenciar o activar) una reacción inmune del mamífero a un antígeno codificado.

A tal fin, el vector adenovirico del no subgrupo C del procedimiento de la invención, comprende, preferiblemente, una proteína de fibra adenovirica que comprende una secuencia de aminoácido que comprende aproximadamente 80% o más de identidad con una secuencia de aminoácido que codifica una proteína de fibra adenovirica que se une a CAR para mediar en la entrada del virus dentro de una célula huésped. Las proteínas de fibra adenoviricas que se unen a CAR están descritas, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional WO 00/15823. De manera ideal, la proteína de fibra adenovirica del vector adenovirico del no subgrupo C comprende una secuencia de aminoácido que comprende aproximadamente 80% o más de identidad con una secuencia de aminoácido que codifica una proteína de fibra adenovirica del subgrupo C. Incluso más preferiblemente, el vector adenovirico del no subgrupo C comprende proteínas de fibra adenoviricas del subgrupo C (por ejemplo, proteína de fibra adenovirica del serotipo 5) incorporada dentro del cápsido vírico. La inclusión de una proteína de fibra adenovirica que comprende aproximadamente 80% o más de identidad con una proteína de fibra adenovirica del subgrupo C, sirve para la ablación de la unión nativa del vector adenovirico del no sub grupo C, re-direccionando el vector adenovirico a CAR, y sirve como un adyuvante en la potenciación de la respuesta inmune al antígeno codificado. Los adenovirus del subgrupo C incluyen los serotipos adenoviricos 1, 2, 5, y 6. Una proteína de fibra adenovirica del subgrupo C puede incorporarse dentro de la superficie adenovirica no modificada o puede modificarse según sea el deseo del manipulador experto. Como alternativa, puede generarse una proteína de fibra sintética. En cualquier caso, la secuencia de aminoácido de la proteína de fibra adenovirica comprende aproximadamente 80% o más de identidad (por ejemplo, aproximadamente 85% o más de identidad, o aproximadamente 90% o más de identidad) con una secuencia de aminoácido que codifica una proteína de fibra adenovirica de unión a CAR, de manera deseable una proteína de fibra adenovirica del subgrupo C. Preferiblemente, la proteína de fibra adenovirica comprende una secuencia de aminoácido que comprende aproximadamente 95% o más de identidad (por ejemplo, 100% de identidad) con una secuencia de aminoácido que codifica una proteína de fibra adenovirica del subgrupo C.

“Identidad”, con respecto a las secuencias de aminoácido o de polinucleótido, se refiere al porcentaje de restos o bases que son idénticos en las dos secuencias cuando las secuencias están óptimamente alineadas. Si, en el alineamiento óptimo, una posición en una primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, las secuencias muestran identidad con respecto a dicha posición. La proporción de identidad entre dos secuencias (o “por ciento de identidad de secuencias”) se mide como una relación del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias con respecto al tamaño de las secuencias (es decir, por ciento de identidad de secuencias = (número de posiciones idénticas/número total de posiciones) x 100). Se conocen un cierto número de algoritmos matemáticos para la rápida obtención del alineamiento óptimo y para el cálculo de la identidad entre dos o más secuencias y se encuentran incorporados en un cierto número de programas de software disponibles. Los ejemplos de dichos programas incluyen los programas MATCH-BOX, MULTAIN, GCG, FASTA, y ROBUST para el análisis de secuencias de aminoácidos, y los programas

SIM, GAP, NAP, LAP2, GAP2, y PIPMAKER para secuencias de nucleótidos. Los programas para análisis de software preferidos tanto para análisis de secuencias de aminoácidos como de polinucleótidos, incluyen los programas ALIGN, CLUSTAL-W (por ejemplo, la versión 1.6 y posteriores versiones del mismo), y BLAST (por ejemplo, BLAST 2.1, BL2SEQ, y posteriores versiones de los mismos).

- 5 Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fibra adenovírica puede ser suficientemente similar a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fibra adenovírica del subgrupo C como para hibridarse bajo condiciones de restricción al menos moderada, preferiblemente alta, y retener la actividad biológica. Los ejemplos de condiciones de restricción moderadas incluyen la incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende formamida al 20%, 5xSSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1xSSC a aproximadamente 37-50°C, o condiciones substancialmente similares, por ejemplo, las condiciones moderadamente restrictivas descritas en Sambrook y otros, en Molecula Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), y Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, (1984). Las condiciones de alta restricción son condiciones que usan, por ejemplo, (1) baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, tal como cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1% a 50°C, (2) uso de un agente desnaturizante durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona (PVP) al 1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C, o (3) uso de formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado por ultrasonidos (50 mg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a (i) 42°C en 2xSSC, (ii) a 55°C en formamida al 50%, y (iii) a 55°C en 0,1xSSC (preferiblemente en combinación con EDTA).

Por otra parte, el vector adenovírico no necesita comprender una proteína de fibra entera en la que la secuencia de aminoácido sea 80% o más idéntica a una secuencia de aminoácido de una proteína de fibra adenovírica intacta que se une a CAR, por ejemplo, una proteína de fibra adenovírica del subgrupo C. En una realización separada, el vector adenovírico puede comprender una proteína de fibra adenovírica quimérica, comprendiendo al menos una porción de la cual una secuencia de aminoácido que sea nativa para el genoma del vector adenovírico o una secuencia de aminoácido que sea 80% o más idéntica a una secuencia de aminoácido que codifique una proteína de fibra adenovírica del adenovirus del no subgrupo C (por ejemplo, un adenovirus del mismo subgrupo y, opcionalmente, serotipo) como el genoma del vector adenovírico. A este respecto, la proteína de fibra adenovírica quimérica, comprende igualmente una secuencia de aminoácido de una proteína de fibra adenovírica del subgrupo C. A fin de ilustrar, pero no limitar el ámbito de la invención, puede construirse un vector adenovírico del serotipo 35 (o del serotipo 41) que comprenda una fibra adenovírica que tenga una región de cola, tallo, y botón. La región de cola de fibra adenovírica es nativa con respecto al vector adenovírico, mientras que las regiones de tallo y botón son regiones de fibra adenovíricas del serotipo 5. Como alternativa, la fibra adenovírica comprende regiones de cola y tallo adenovíricas del serotipo 35 y un botón de fibra adenovírica del serotipo 5. Además, la proteína de fibra quimérica puede modificarse tal como se describe en la presente invención para, por ejemplo, incrementar la antigenicidad, modular la tropicidad, y/o mostrar epítomos antigénicos sobre la superficie vírica.

El serotipo 41 antivírico comprende dos tipos distintos de proteína de fibra, una proteína de fibra larga y una proteína de fibra corta, incorporadas dentro de la cápsida vírica. De acuerdo con ello, una o ambas de las proteínas de fibra de vectores adenovíricos del serotipo 41 pueden modificarse tal como se describe en la presente invención. Por ejemplo, la proteína de fibra adenovírica larga del serotipo 41, la cual se une a CAR, puede retenerse en tanto que la fibra corta adenovírica del serotipo 41 es reemplazada con una proteína de fibra adenovírica del serotipo 5 o del serotipo 2. Como alternativa, la fibra corta puede manipularse genéticamente para que sea una fibra adenovírica quimérica del serotipo 41 o del serotipo 5, tal como se ha descrito anteriormente. Además, la fibra corta puede manipularse genéticamente para que incluya un ligando, tal como un ligando que contiene RDG, para tipos de células diana específicas. Los vectores adenovíricos del serotipo 41 proporcionan opciones únicas en el contexto del procedimiento de la invención con respecto al incremento de la inmunogenicidad del vector, al tiempo que retiene el tropismo nativo. Esto puede llevarse a cabo no solamente intercambiando la proteína de fibra corta con otra proteína de fibra o creando una proteína de fibra quimérica, sino también modificando la proteína de fibra para crear una proteína antígeno-fibra adenovírica quimérica, mediante la cual la proteína antígeno-fibra quimérica provoca una respuesta inmune al antígeno.

Además de la diferencia(s) en los mecanismos de entrada vírica, los vectores adenovíricos del no subgrupo C y del subgrupo C difieren en cuanto a sus genomas respectivos. Por ejemplo, la región E3 del adenovirus del serotipo 35 comprende al menos dos secuencias de codificación adicionales que la región E3 del adenovirus del serotipo 5 (véase, por ejemplo, Vogels, y otros, J. Virol., vol. 77, (nº, 15), págs. 8263-8271, (2003)). Las secuencias de codificación únicas del adenovirus del no subgrupo C (que no comparte un adenovirus del subgrupo 5) pueden igualmente ser responsables de la atenuación de la regulación de una reacción inmune de un mamífero a un antígeno codificado. El producto(s) del gen codificado por la región del gen temprano E1A, las regiones del gen temprano retardado E1B, E2, E3, y E4, o las regiones tardías L1-L5 del genoma adenovírico, pueden inducir a la célula huésped a producir factores que enmascaren el antígeno codificado, alterar el entorno celular para prevenir o distorsionar la presentación del antígeno a las células efectoras inmunes, estimular la producción de inmuno-represores, inhibir la

producción de inmuno-estimulantes, etc. Para crear vectores adenovíricos del no subgrupo C para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero contra un antígeno codificado, el vector adenovírico puede transformarse en deficiente en una o más funciones del gen de las regiones tempranas o tardías del genoma adenovírico, por ejemplo, mediante la escisión o reemplazo de las regiones del gen relevantes. Como alternativa, una o más regiones del genoma del vector adenovírico (por ejemplo, las regiones E1A, E1B, E2A, E3, E4, L1, L2, L3, L4, y/o L5) pueden reemplazarse por las regiones correspondientes procedentes de un genoma de adenovirus del subgrupo C (preferiblemente, un genoma adenovírico del serotipo 5). Un constructo de vector adenovírico preferido (por ejemplo, para desarrollo de una vacuna) comprende un genoma de vector adenovírico del no subgrupo C (por ejemplo, un genoma de vector adenovírico del serotipo 35 o del serotipo 41), en el que la región E3 y/o E4 del genoma adenovírico ha sido reemplazada con la región(es) correspondiente de un genoma adenovírico del serotipo 5. No obstante, la capacidad de ciertos vectores adenovíricos del no subgrupo C para evadir la inmunidad preexistente y atenuar la regulación de una respuesta inmune contra productos transgénicos, puede ser ventajoso al margen del desarrollo de vacunas, para el suministro de una secuencia de ácido nucleico exógena, por ejemplo, al ojo, oído interior, nódulos linfáticos, cerebro, y corazón, para tratar o prevenir trastornos biológicos.

El vector adenovírico de la invención puede ser competente para replicación. Por ejemplo, el vector adenovírico puede tener una mutación (por ejemplo, una delección, una inserción, o una sustitución) en el genoma adenovírico que no inhiba la replicación vírica en las células huéspedes. No obstante, preferiblemente, el vector adenovírico es deficiente en la replicación. Por "deficiente en la replicación", se entiende que el vector adenovírico comprende un genoma adenovírico que carece de al menos de una función del gen esencial para la replicación (es decir, de manera tal que el vector adenovírico no se replica en células huéspedes típicas, especialmente aquellas en un paciente humano que podrían ser infectadas por el vector adenovírico en el trascurso del procedimiento de la invención). Una deficiencia en un gen, función del gen, o gen o región genómica, tal como se usa en la presente invención, se define como una delección de suficiente material genético del genoma vírico como para deteriorar o borrar la función del gen cuya secuencia de ácido nucleico ha sido eliminada totalmente o en parte. Aunque se prefiere la delección del material genético, la mutación de material genético mediante la adición o sustitución es también apropiada para la interrupción de la función del gen. Las funciones del gen esenciales para la replicación son aquellas funciones del gen que se requieren para la replicación (por ejemplo, propagación) y están codificadas, por ejemplo, por las regiones tempranas adenovíricas (por ejemplo, las regiones E1, E2, y E4), las regiones tardías (por ejemplo, las regiones L1-L5), los genes implicados en la encapsidación vírica (por ejemplo, el gen IVa2), y los ARNs asociados a virus (por ejemplo, VA-RNA1 y/o VA-RNA-2). Más preferiblemente, el vector adenovírico deficiente para la replicación comprende un genoma adenovírico deficiente en al menos una función del gen esencial para la replicación de una o más regiones del genoma adenovírico. Preferiblemente, el vector adenovírico es deficiente en al menos una función del gen de la región E1A, la región E1B, o la región E4 del genoma adenovírico requerido para replicación vírica (denominado vector adenovírico deficiente en E1 o deficiente en E4). Además de una deficiencia en la región E1, el adenovirus recombinante puede tener igualmente una mutación en el promotor tardío principal (MLP), tal como se divulga en la Solicitud de Patente Internacional WO 00/00628. Lo más preferiblemente, el vector adenovírico es deficiente en al menos una función del gen esencial para la replicación (de manera deseable, todas las funciones esenciales para la replicación) de la región E1 y al menos una función de la región E3 no esencial (por ejemplo, una delección XbaI de la región E3) (denominada un vector adenovírico deficiente en E1/E3). Con respecto a la región E1, el vector adenovírico puede ser deficiente en toda o en parte de la región E1A y en toda o parte de la región E1B. A fin de ilustrar, pero no limitar esta realización, un vector adenovírico del serotipo 35 puede comprender una delección E1 de los nucleótidos 570 a 3484. Cuando el vector adenovírico es deficiente en al menos una función del gen esencial para la replicación en únicamente una región del genoma adenovírico (por ejemplo, un vector adenovírico deficiente en E1 o E1/E3), al vector adenovírico se le refiere como "individualmente deficiente para la replicación".

El vector adenovírico de la invención puede ser "múltiplemente deficiente para la replicación", lo cual significa que el vector adenovírico es deficiente en una o más funciones del gen esenciales para la replicación en cada una de dos o más regiones del genoma adenovírico. Por ejemplo, el vector adenovírico deficiente en E1 o deficiente en E1/E3 anteriormente mencionado, puede ser además deficiente en al menos una función del gen esencial para la replicación de la región E4 (denominado un vector adenovírico deficiente en E1/E4 o E1/E3/E4), y/o la región E2 (denominado un vector adenovírico deficiente en E1/E2 o E1/E2A/E3), preferiblemente la región E2A (denominado un vector adenovírico deficiente en E1/E2A o E1/E2A/E3).

Mediante la eliminación de todo o parte de, por ejemplo, las regiones E1, E3, y E4 del genoma adenovírico, el vector adenovírico resultante es capaz de aceptar insertos de secuencias de ácido nucleico exógenas al tiempo que retiene la capacidad para ser encapsidado dentro de cápsidas adenovíricas. La secuencia de ácido nucleico puede estar posicionada en la región E1, la región e3, o la región E4 del genoma adenovírico. Realmente, la secuencia de ácido nucleico puede insertarse en cualquier sitio dentro del genoma adenovírico siempre y cuando que la posición no evite la expresión de la secuencia del ácido nucleico o interfiera con la encapsidación del vector adenovírico. El vector adenovírico puede, igualmente, comprender múltiples (es decir, dos o más) secuencias de ácido nucleico que codifiquen el mismo antígeno. Como alternativa, el vector adenovírico puede comprender múltiples secuencias de ácido nucleico que codifican dos o más antígenos diferentes. Cada secuencia de ácido nucleico puede estar ligada de manera operable al mismo promotor, o a diferentes promotores, dependiendo del perfil de expresión deseado por el experto en manipulación, y puede insertarse en la misma región del genoma adenovírico (por ejemplo, la región E4) o en diferentes regiones del genoma adenovírico.

El vector adenovirico, cuando se multiplica como deficiente para la replicación, especialmente en funciones del gen esenciales para la replicación de las regiones E1 y E4, incluye, preferiblemente, una secuencia espaciadora a fin de proporcionar el crecimiento vírico en una línea de células complementaria similar a la lograda mediante vectores adenoviricos individualmente deficientes para la replicación, particularmente un vector adenovirico deficiente en E1.

5 La secuencia espaciadora puede contener cualquier secuencia o secuencias de nucleótido que tengan una longitud deseada, tales como secuencias de al menos aproximadamente 15 pares de bases (por ejemplo, entre aproximadamente 15 pares de bases y aproximadamente 12.000 pares de bases), preferiblemente aproximadamente 100 pares de bases hasta aproximadamente 10.000 pares de bases, más preferiblemente aproximadamente 500 pares de bases hasta aproximadamente 8.000 pares de bases, incluso más preferiblemente aproximadamente 1.500 pares de bases hasta aproximadamente 6.000 pares de bases, y lo más preferiblemente aproximadamente 2.000 hasta aproximadamente 3.000 pares de bases de longitud. La secuencia del elemento espaciador puede ser de codificación o de no codificación y nativa o no nativa con respecto al genoma adenovirico, pero no restaura la función esencial para la replicación a la región deficiente. Preferiblemente, el elemento espaciador está localizado en la región E4 del genoma adenovirico. El uso de un espaciador en un vector adenovirico está descrito en la Patente de EE.UU. 5.851.806.

Se ha observado que, al menos un vector adenovirico deficiente en E4 expresa un transgen a altas proporciones durante una cantidad de tiempo limitada *in vivo* y que la persistencia de expresión de un transgen en al menos un vector adenovirico deficiente en E4, puede modularse mediante la acción de un factor trans-actuante, tal como HSV ICP0, Ad pTP, CMV-IE2, CMV-IE86, HIV tat, HTLV-tax, HBV-X, AAV Rep 78, el factor celular procedente de la línea de células de osteosarcoma U205 que funciona como el HSV ICP0, o el factor celular en células PC12 que está inducido por el factor de crecimiento de nervios, entre otros, tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 6.225.113, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 2002/0031823 A1, y la Solicitud de Patente Internacional WO 00/34496. A la vista de lo anterior, un vector adenovirico múltiplemente deficiente (por ejemplo, el al menos vector adenovirico deficiente en E4), o un segundo vector de expresión, comprende, de manera deseable, una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor trans-actuante que modula la persistencia de expresión de la secuencia de ácido nucleico. La expresión persistente de ADN antigénico puede ser deseada cuando se genera inmunotolerancia.

El vector adenovirico puede ser deficiente en funciones del gen esenciales para la replicación de únicamente las regiones tempranas del genoma adenovirico, de únicamente las regiones tardías del genoma adenovirico, y de tanto las regiones tempranas como tardías del genoma adenovirico. Igualmente, el vector adenovirico puede tener esencialmente eliminado el genoma adenovirico entero, en cuyo caso, se prefiere que al menos o bien las repeticiones terminales invertidas (ITRs) víricas y uno o más promotores o bien las ITRs y una señal de encapsidación, se dejen intactas (es decir, un amplicon adenovirico). En una realización, el vector adenovirico de la invención comprende un genoma adenovirico que carece de secuencias de ácido nucleico nativas, las cuales codifican proteínas adenoviricas. Los elementos genómicos adenoviricos requeridos para la replicación y encapsidación del genoma adenovirico dentro de proteínas cápsidas adenoviricas pueden ser retenidos. Los vectores adenoviricos mínimos que carecen de secuencias de codificación de proteína adenovirica se denominan vectores adenoviricos "dependientes del ayudante", y frecuentemente requieren complementación mediante adenovirus ayudante para una eficaz propagación. Los vectores adenoviricos deficientes para la replicación adecuados, incluyendo los vectores adenoviricos múltiplemente deficientes para la replicación, están descritos en las Patentes de EE.UU. 5.837.511; 5.851.806; 5.994.106; 6.127.175; y 6.482.616; las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de EE.UU. 2001/0043922 A1, 2002/0004040 A1, 2002/0031831 A1, y 2002/0110545 A1, y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 94/28152, WO 95/02697, WO 95/16772, WO 95/34671, WO 96/22378, WO 97/12986, WO 97/21826, y WO 03/022311. De manera ideal, el vector adenovirico deficiente para la replicación está presente en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, substancialmente libre de contaminación por adenovirus competente para la replicación (RCA) (por ejemplo, la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 1% de contaminación por RCA). Lo más deseablemente, la composición está libre de RCA. Las composiciones y productos de vectores adenoviricos que están libres de RCA, están descritos en la Patente de EE.UU. 5.944.106, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. 2002/0110545 A1, y la Solicitud de Patente Internacional WO 95/34671.

Si el vector adenovirico no es deficiente para la replicación, de manera ideal el vector se manipula a fin de limitar la replicación del vector dentro de un tejido diana. Por ejemplo, el vector adenovirico puede ser un vector adenovirico de replicación condicional, el cual está manipulado genéticamente con el fin replicarse bajo condiciones predeterminadas por el manipulador experto. Por ejemplo, las funciones del gen esenciales para la replicación, por ejemplo, funciones del gen codificadas por las regiones tempranas adenoviricas, pueden ligarse de manera operable a una secuencia de control de transcripción inducible, represible, o específica del tejido, por ejemplo, promotor. En esta realización, la replicación requiere la presencia o ausencia de factores específicos que interactúen con la secuencia de control de transcripción. En el tratamiento de una enfermedad autoinmune, puede ser ventajoso el controlar la replicación del vector adenovirico, por ejemplo, en núdulos linfáticos, para obtener la producción continua de antígeno y el control de la producción de células inmunes. Los vectores adenoviricos de replicación condicional están descritos además en la Patente de EE.UU. 5.998.205.

El vector adenovirico del procedimiento de la invención comprende una proteína de fibra adenovirica, en la que la secuencia de aminoácido de la proteína de fibra adenovirica es 80% o más idéntica a la de una proteína de fibra adenovirica del subgrupo C. Las proteínas de recubrimiento del vector adenovirico, incluyendo la proteína de fibra

del vector adenovirico, pueden modificarse para potenciar o reducir la inmunogenicidad, ampliar o restringir el tropismo del vector, y/o mostrar uno o más antígenos sobre la superficie vírica, mediante la eliminación y/o inserción de aminoácidos. Por ejemplo, el vector adenovirico puede comprender una proteína de recubrimiento quimérica que comprende una secuencia de aminoácido no nativa que se une a un sustrato (es decir, un ligando). La secuencia de aminoácido no nativa de la proteína de recubrimiento adenovirica quimérica permite que un vector adenovirico que comprende la proteína de recubrimiento adenovirica quimérica se una y, de manera deseable, infecte células huésped no infectadas de manera natural por el adenovirus correspondiente sin la secuencia de aminoácido no nativo (es decir, células huésped no infectadas por el adenovirus de tipo salvaje correspondiente), se unan a células huésped infectadas de manera natural por el adenovirus correspondiente con mayor afinidad que el adenovirus correspondiente sin la secuencia de aminoácido no nativa, o se unan a células diana particulares con mayor afinidad que las células no diana. Por "unirse preferencialmente" se entiende que la secuencia de aminoácido no nativa se une a un receptor, tal como, por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_3$, con al menos aproximadamente 3 veces más afinidad (por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 35 veces, 45 veces, o 50 veces más afinidad) que el ligando no nativo se une a un receptor diferente, tal como, por ejemplo, integrina $\alpha_v\beta_1$.

De manera deseable, el vector adenovirico comprende una proteína de recubrimiento quimérica que comprende una secuencia de aminoácido no nativa que confiere a la proteína de recubrimiento quimérica la capacidad para unirse a una célula inmune más eficazmente que una proteína de recubrimiento adenovirica de tipo salvaje. En particular, el vector adenovirico puede comprender una proteína de fibra adenovirica quimérica que comprende una secuencia de aminoácido no nativa que facilita la fijación del vector adenovirico por células inmunes, preferiblemente células que presentan antígeno, tales como células dendríticas, monocitos, y macrófagos. En una realización preferida, el vector adenovirico comprende una proteína de fibra quimérica que comprende una secuencia de aminoácido (por ejemplo, una secuencia de aminoácido no nativa) que comprende un motivo RGD que incluye, pero sin limitarse a ellas, CRGDC (SEC ID NO:1), CXCRGDCXC (SEC ID NO:2), en la que X representa cualquier aminoácido, y CDCRGDCFC (SEC ID NO:3), que incrementa la eficacia de transducción de un vector adenovirico dentro de células dendríticas. El motivo RGD, o cualquier ligando de secuencia de aminoácido no nativa, preferiblemente se inserta dentro de la región botón de fibra adenovirica, de manera ideal en una hélice expuesta del botón adenovirico, tal como la hélice HI. Igualmente, puede adjuntarse una secuencia de aminoácido no nativa al C-terminal de la proteína de fibra adenovirica, opcionalmente mediante una secuencia espaciadora.

En los casos en que las células dendríticas tienen la célula diana deseada, la secuencia de aminoácido no nativa puede reconocer una proteína que típicamente se encuentra sobre superficies de células dendríticas tales como proteínas de adhesión, receptores quimiocina, receptores complemento, proteínas de co-estimulación, receptores citocina, moléculas que presentan alto nivel de antígeno, proteínas "homing", proteínas marcadoras, receptores para la fijación de antígeno, proteínas señal, receptores de virus, etc. Los ejemplos de dichos sitios potenciales de unión de ligandos en células dendríticas incluyen integrinas $\alpha_v\beta_3$, integrinas $\alpha_v\beta_5$, 2A1, receptores 7-TM, CD1, CD11a, CD11b, CD11c, CD21, CD24, CD32, CD4, CD40, variantes CD44, CD46, CD49d, CD50, CD54, CD58, CD64, ASPGR, CD80, CD83, CD86, E-cadherina, integrinas, M342, MHC-I, MHC-II, MIDC-8, MMR, OX62, p200-MR6, p55, S 100, TNF-R, etc. Preferiblemente, en los casos en que las células dendríticas están identificadas como una diana, el ligando reconoce la proteína de superficie de célula CD40, tal como, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo (b)específico CD-40 o un dominio obtenido de I polipéptido CD40L.

En el caso en que los macrófagos sean la diana deseada, la secuencia de aminoácido no nativa puede reconocer una proteína que típicamente se encuentra sobre superficies de células del macrófago, tales como receptores fosfatidilserina, receptores vitronectina, integrinas, receptores de adhesión, receptores implicados en la transducción de señal y/o inflamación, marcadores, receptores para inducción de citocinas, o receptores sobre-regulados tras exposición por patógenos, miembros de la superfamilia rica en cisteína del receptor purificador (SRCR) del grupo B, receptores de unión del ácido siálico, miembros de la familia del receptor Fc, moléculas de superficie B7-1 y B7-2, receptores de linfocitos, receptores de leucocitos, moléculas que presentan antígenos, y similares. Los ejemplos de proteínas diana de superficie de macrófagos adecuadas incluyen, pero sin limitarse a las mismas, proteoglicanos de sulfato de heparina, integrinas $\alpha_v\beta_3$, integrinas $\alpha_v\beta_5$, B7-1, B7-2, CD11c, CD13, CD16, CD163, CD1a, CD22, CD23, CD29, CD32, CD33, CD36, CD44, CD45, CD49e, CD52, CD53, CD54, CD71, CD87, CD9, CD98, receptores Ig, proteínas del receptor Fc (por ejemplo, subtipos de Fc α , Fc γ , Fc ϵ , etc.), receptor b de foliato, HLA Clase I, Sialoadhesina, siglec-5, y el receptor-2 tipo campana (TLR2).

En el caso en que las células B sean la diana deseada, el ligando puede reconocer una proteína que típicamente se encuentra sobre superficies de célula B, tales como integrinas y otras moléculas de adhesión, receptores complemento, receptores de interleuquina, receptores de fagocitos, receptores de inmunoglobulinas, marcadores de activación, receptores de transferrina, miembros de la superfamilia rica en cisteína del receptor purificador (SRCR), receptores del factor de crecimiento, selectinas, moléculas MHC, receptores de TNF, y factores asociados a TNF-R. Los ejemplos de proteínas de superficie de célula B típicos incluyen β -glucano, receptor de antígeno de célula B (BAC), B7-2, receptor de célula B (BCR), receptor C3d, CD1, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD35, CD40, CD5, CD6, CD69, CD71, dímero CD79a/CD79b, CD95, endoglina, antígeno Fas, receptores Ig humanos, proteínas del receptor Fc (por ejemplo, subtipos de Fc α , Fc γ , Fc ϵ , etc.), IgM, gp200-MR6, receptor de la hormona del crecimiento (GH-R), ICAM-1, ILT2, CD85, moléculas MHC clase I y II, receptor del factor de crecimiento de transformación (TGF-R), integrina $\alpha_4\beta_7$, e integrina $\alpha_v\beta_3$.

En otra realización, el vector adenovirico comprende una proteina de recubrimiento de virus quimerica no selectiva para un tipo especifico de célula eucariótica. La proteina de recubrimiento quimerica difiere de la proteina de recubrimiento de tipo salvaje por una inserción de una secuencia de aminoácido no nativa dentro, o en lugar, de una secuencia de proteina de recubrimiento interna, o por la unión de una secuencia de aminoácido no nativa al N- o C-terminal de la proteina de recubrimiento. Por ejemplo, un ligando que comprende aproximadamente cinco a aproximadamente nueve restos de lisina (preferiblemente, siete restos de lisina) está unido al C-terminal de la proteina de fibra adenovirica mediante una secuencia espaciadora de no codificación. En esta realización, la proteina de recubrimiento de virus quimerica se une de manera eficaz a un intervalo más amplio de células eucarióticas que un recubrimiento de virus de tipo salvaje, tal como se describe en la Patente de EE.UU. 6.465.253 y la Solicitud de Patente Internacional WO 97/20051. Se prefiere un vector adenovirico de este tipo a fin de asegurar la extensa producción del antígeno.

La capacidad de un vector adenovirico para reconocer una célula huésped potencial puede modularse sin manipulación genética de la proteina de recubrimiento, es decir, a través del uso de una molécula bi-especifica. Por ejemplo, mediante el acomplejamiento de un adenovirus con una molécula bi-especifica que comprende un dominio de unión de base pentón y un dominio que se une de manera selectiva a un sitio de unión de superficie de célula particular, se facilita la identificación del sitio diana del vector adenovirico para un tipo de célula particular. Igualmente, puede conjugarse un antígeno a la superficie de la partícula adenovirica a través de medios no genéticos.

Una secuencia de aminoácido no nativa puede conjugarse a cualquiera de las proteínas de recubrimiento adenoviricas para formar una proteina de recubrimiento adenovirica quimerica. De acuerdo con ello, por ejemplo, una secuencia de aminoácido no nativa puede conjugarse con, insertarse en, o unirse a una proteina de fibra, una proteina de base pentón, una proteina hexón, proteínas IX, VI, o IIIa, etc. Las secuencias de dichas proteínas, y procedimientos para el uso de las mismas en proteínas recombinantes, son bien conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 5.543.328; 5.559.099; 5.712.136; 5.731.190; 5.756.086; 5.770.442; 5.486.782; 5.962.311; 5.965.541; 5.846.782; 6.057.155; 6.127.525; 6.153.435; 6.329.190; 6.453.314; 6.465.253; 6.576.456; 6.649.407; 6.740.525, y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 96/07734, WO 96/26281, WO 97/20051, WO 98/07877, WO 98/07865, WO 98/40509, WO 98/54346, WO 00/15823, y WO 01/589940). La proteina de recubrimiento adenovirica quimerica puede generarse usando técnicas de ADN recombinante convencionales conocidas en la técnica y descritas en la presente invención. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteina de recubrimiento adenovirica quimerica está localizada dentro del genoma adenovirico y está ligada de manera operable a un promotor que regula la expresión de la proteina de recubrimiento en un adenovirus de tipo salvaje. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteina de recubrimiento adenovirica quimerica está localizada dentro del genoma adenovirico y es parte de una caja de expresión que comprende los elementos genéticos requeridos para la expresión eficaz de la proteina de recubrimiento quimerica (por ejemplo, una secuencia de control de expresión heteróloga tal como se describe en la presente invención).

La porción de proteina de recubrimiento de la proteina de recubrimiento adenovirica quimerica puede ser una proteina de recubrimiento de longitud total la cual tiene adjuntado el dominio ligando, o puede estar truncada, por ejemplo, internamente o en el C- y/o N-terminal. No obstante estar modificada (incluyendo la presencia del aminoácido no nativo), la proteina de recubrimiento quimerica es capaz, preferiblemente, de incorporar dentro una cápsida adenovirica. En el caso de la secuencia de aminoácido no nativa esté unida a la proteina de fibra, preferiblemente esta no molesta la interacción entre proteínas víricas o monómeros de fibras. Así, la secuencia de aminoácido no nativa preferiblemente no es por sí misma un dominio de oligomerización, ya que como tal puede interactuar negativamente con el dominio de trimerización de la fibra adenovirica. Preferiblemente, la secuencia de aminoácido no nativa se agrega a la proteina virión, y se incorpora de una manera tal que está fácilmente expuesta a un sustrato, receptor de superficie de célula, o célula inmune (por ejemplo, en el N- o C-terminal de la proteina adenovirica, unida a un resto enfrentado a un sustrato, posicionado sobre un espaciador péptido, etc.) con el fin de exponer lo máximo posible la secuencia de aminoácido no nativa. De manera ideal, la secuencia de aminoácido no nativa se incorpora dentro de una proteina de fibra adenovirica en el C-terminal de la proteina de fibra (y unida mediante un espaciador) o incorporada dentro de una hélice expuesta (por ejemplo, la hélice HI) de la fibra, a fin de crear una proteina de recubrimiento quimerica. En el caso en que la secuencia de aminoácido no nativa está unida a, o reemplaza a una porción de base pentón, preferiblemente esta está dentro de las regiones hipervariables a fin de asegurar que está en contacto con el sustrato. En el caso en que la secuencia de aminoácido no nativa está unida al hexón, preferiblemente esta está dentro de una región hipervariable (Mikszs y otros, *J. Virol.*, vol. 70, (nº. 3), págs. 1836-1844, (1996)). En el caso en que el aminoácido no nativo está unido o reemplaza a una porción de pIX, preferiblemente esta está dentro del C-terminal de pIX. El uso de una secuencia espaciadora para extender la secuencia de aminoácido no nativa más allá de la superficie de la partícula adenovirica, puede ser ventajoso dado que la secuencia de aminoácido no nativa puede estar más disponible para la unión a un receptor, y puede reducirse cualquier interacción estérica entre la secuencia de aminoácido no nativa y los monómeros de fibra adenoviricos.

Aunque preferiblemente se usa un vector adenovirico del no subgrupo C en la invención para evitar la inmunidad existente e incrementar la persistencia del vector en el mamífero, el vector adenovirico comprende una fibra adenovirica que entra en las células huéspedes a través de la unión CAR (por ejemplo, una proteina de fibra adenovirica del subgrupo C) para provocar una respuesta inmune contra el antígeno codificado. A tal fin, la proteina de fibra adenovirica puede comprender una secuencia de aminoácido no nativa que da como resultado una inmunogenicidad incrementada (antigenicidad) del vector adenovirico en comparación con un vector adenovirico que es el mismo,

excepto por la presencia de la secuencia de aminoácido no nativa en la proteína de fibra adenovírica. Por ejemplo, una secuencia de aminoácido no nativa que comprende un motivo RGD puede insertarse dentro de la proteína de fibra adenovírica, lo cual potencia la inmunogenicidad de la proteína en un mamífero. Por ejemplo, una secuencia de aminoácido no nativa que comprende CRGDC (SEC ID NO:1) puede insertarse dentro o adjuntarse a la proteína de fibra adenovírica. Otras secuencias de aminoácido no nativas que contienen RGD adecuadas incluyen pero sin limitarse a ellas, CXCRGDCXC (SEC ID NO:2), en la que X puede ser cualquier aminoácido, y CDCRGDCFC (SEC ID NO: 3). La proteína de fibra adenovírica (u otra proteína de recubrimiento adenovírica) puede igualmente modificarse por medios no genéticos para incrementar el efecto adyuvante de la partícula vírica.

Si se desea, la unión nativa de proteínas de recubrimiento adenovíricas a un receptor de superficie de célula puede interrumpirse, reduciéndose, de esta forma, la transducción de células huéspedes. En esta realización, los sitios de unión nativos localizados sobre las proteínas de recubrimiento adenovíricas que median la entrada de la célula, por ejemplo, la fibra y/o la base pentón, están ausentes o interrumpidas. Se estima que dos o más de las proteínas de recubrimiento adenovíricas median en la unión a superficies de células (por ejemplo, la fibra y base pentón). Puede usarse cualquier técnica adecuada para alterar la unión nativa a una célula huésped (por ejemplo, la unión al receptor de virus Coxsackie y adenovirus (CAR)). Por ejemplo, el aprovechamiento de las diferentes longitudes de fibras puede llevarse a cabo para separar la unión nativa de las células mediante la adición de una secuencia de unión a la base pentón o botón de fibra. Esta adición puede realizarse o bien directamente o bien indirectamente a través de una secuencia de unión bi-específica o multi-específica. Como alternativa, la proteína de fibra adenovírica puede modificarse para reducir el número de aminoácidos en el tallo de la fibra, creándose, de esta forma, una fibra "de tallo corto" (tal como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.962.311).

Como alternativa, los restos de ácido nucleico asociados con la unión del substrato nativo pueden mutarse (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional WO 00/15823; Einfeld y otros, *J. Virol.*, vol. 75, (nº. 23), págs. 11284-11291, (2001); y van Beusechem y otros, *J. Virol.*, vol. 76, (nº. 6), págs. 2753-2762, (2002)), de manera tal que el vector adenovírico que incorpora los restos de ácido nucleico mutados es menos capaz de unir su substrato nativo. Por ejemplo, los adenovirus de serotipos 2 y 5 transducen células mediante la unión de la proteína de fibra adenovírica a CAR y la unión de proteínas pentón a integrinas localizadas sobre la superficie de la célula. El vector adenovírico puede carecer de unión de receptor nativo, por ejemplo, a CAR y/o mostrar unión nativa reducida a integrinas mediante la eliminación o interrupción del CAR nativo y/o los sitios de unión de integrina (por ejemplo, la secuencia RGD localizada en la base pentón adenovírica). Igualmente, puede reducirse o separarse la unión nativa de proteínas de fibra adenovíricas del subgrupo B2 a CD46. La eliminación o mutación de sitios de unión nativos puede reducir de manera significativa la unión nativa (es decir, una proteína de fibra adenovírica quimérica modificada se une a un receptor de superficie de célula nativa con al menos aproximadamente 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 50 veces, o 100 veces menos afinidad que una proteína de fibra adenovírica no modificada del mismo serotipo).

Preferiblemente, el vector adenovírico comprende una proteína de recubrimiento quimérica (por ejemplo, una fibra adenovírica quimérica, hexón, o proteína pIX) que comprende una secuencia de aminoácido que codifica un antígeno. Los antígenos son presentados a las células efectoras inmunes por células que presentan antígenos en dos formatos reconocibles. Los antígenos capturados y recogidos por células que presentan antígenos son procesados y presentados sobre la superficie de la célula por complejos de histocompatibilidad mayor II (MHC II). Los antígenos presentados por MHC II estimulan las células ayudantes e, indirectamente, las células citotóxicas T, así como la respuesta inmune humoral mediada por células B. El antígeno codificado por la secuencia de ácido nucleico del vector adenovírico está expresada dentro de la célula y está presentada sobre el antígeno que presenta la superficie de célula asociada con MHC I, lo cual activa las células citotóxicas T. De acuerdo con ello, la invención contempla un procedimiento bi-dentado de presentación de antígenos al sistema inmune mediante el suministro de epítomos antigénicos sobre la superficie vírica y la producción de antígenos intracelularmente, dando como resultado una respuesta inmune potenciada en comparación con la generada por la presentación de antígeno MHC I o MHC II únicamente. Los procedimientos para provocar una respuesta inmune mediada por MHC I y MHC II están descritos adicionalmente en la Solicitud de Patente Internacional WO 01/58478.

Las modificaciones adecuadas a un vector adenovírico se encuentran descritas en las Patentes de EE.UU. 5.543.328; 5.559.099; 5.712.136; 5.731.190; 5.756.086; 5.770.442; 5.846.782; 5.871.727; 5.885.808; 5.922.315; 5.962.311; 5.965.541; 6.057.155; 6.127.525; 6.153.435; 6.329.190; 6.455.314; 6.465.253; 6.576.456; 6.649.407; y 6.740.525; las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de EE.UU. 2001/0047081 A1, 2002/0099024 A1, 2002/0151027 A1, 2003/0022355 A1, y 2003/0099619 A1, y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 96/07734, WO 96/26281, WO 97/20051, WO 98/07865, WO 98/07877, WO 98/40509, WO 98/54346, WO 00/15823, WO 01/58940, y WO 01/92549.

La invención proporciona además un vector adenovírico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX adenovírica ligada de manera operable a una secuencia de control de expresión heteróloga. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína pIX adenovírica de tipo salvaje, algunos ejemplos de las cuales están establecidos en la SEC ID Nos: 4-10; sin embargo, la invención no está limitada a estas secuencias a modo de ejemplos. Realmente, las secuencias genéticas pueden variar entre diferentes cepas, y esta ámbito natural de variación alélica está incluida dentro del ámbito de la invención. De acuerdo con ello, la secuencia de ácido nucleico codifica, preferiblemente, una proteína pIX que es al menos aproximadamente 75% homóloga a al

menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de una de las SEC ID NOs: 4-10 y preferiblemente es al menos aproximadamente 80% homóloga a al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de una de las SEC ID NOs: 4-10 (por ejemplo, al menos aproximadamente 85% homóloga a al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de una de las SEC ID NOs: 4-10); más preferiblemente la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína pIX que es al menos aproximadamente 90% homóloga a al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de una de las SEC ID NOs: 4-10 (tal como al menos aproximadamente 95% homóloga a al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de una de las SEC ID NOs: 4-10), y lo más preferiblemente la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína pIX que es al menos aproximadamente 97% homóloga a al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de una de las SEC ID NOs: 4-10. Preferiblemente, la homología se extiende a al menos 25 aminoácidos contiguos, tal como al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos. La determinación del grado de homología, incluyendo la posibilidad de espacios, puede llevarse a cabo usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica (por ejemplo, el procedimiento de Clustal o J. Hein usando la tabla de pesos de restos PAM100 o PAM250, BLASTp, etc.). La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína pIX puede obtenerse a partir de cualquier fuente, por ejemplo, aislada a partir de la naturaleza, generado sintéticamente, aislada a partir de un organismo manipulado genéticamente, y similares. Aunque se prefiere que la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína pIX adenovírica esté localizada en el genoma adenovírico, la secuencia de ácido nucleico puede introducirse dentro de una línea de células complementaria adecuada (por ejemplo, sobre un plásmido) conjuntamente con el vector adenovírico.

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX adenovírica está ligada de manera operable a una secuencia de control de expresión heteróloga. Una "secuencia de control de expresión" es cualquier secuencia de ácido nucleico que promueve, potencia, o controla la expresión (típicamente y preferiblemente la transcripción) de otra secuencia de ácido nucleico. Típicamente y preferiblemente, la secuencia de control de expresión comprende ADN de doble hebra. Como alternativa, la secuencia de control de expresión comprende ARN de doble hebra, un híbrido ARN-ADN, o nucleótidos generados sintéticamente. Preferiblemente, la secuencia de control de expresión comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que funciona dirigiendo la unión de ARN polimerasa y, de esta forma, promueve la transcripción de la secuencia de ácido nucleico ligada de manera operable (por ejemplo, una secuencia promotora o porción de la misma). Como alternativa, la secuencia de control de expresión comprende, consiste en, o consiste esencialmente en una secuencia de ácido nucleico que funciona dirigiendo el corte y empalme de la secuencia de ácido nucleico ligada de manera operable dentro de una molécula de ARNm transcrita a partir de una secuencia de control de expresión más arriba (por ejemplo, una secuencia aceptante de corte y empalme). Una secuencia de ácido nucleico está "ligada de manera operable" a una secuencia de control de expresión cuando la secuencia de control de expresión es capaz de promover, potenciar, o controlar la expresión (típicamente y preferiblemente la transcripción) de dicha secuencia de ácido nucleico.

La secuencia de control de expresión es "heteróloga" dado que la secuencia de control de expresión es diferente de, o está en una posición relativa diferente, del promotor ligado de manera operable a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína pIX en un adenovirus de tipo salvaje. Preferiblemente, la secuencia de control de expresión heteróloga no se obtiene a partir de, o procede de, o se basa en un promotor de pIX adenovírico que se produce de manera natural. Una secuencia de control de expresión se "obtiene" a partir de una fuente cuando esta se aísla a partir de dicha fuente. Una secuencia de control de expresión "procede" de una fuente cuando esta comprende una secuencia aislada a partir de una fuente pero modificada de cualquier manera adecuada (por ejemplo, mediante mutación u otra modificación de la secuencia). Una secuencia de control de expresión se "basa en" una fuente cuando su secuencia es altamente homóloga con la fuente pero se ha obtenido a través de procedimientos de síntesis (por ejemplo, síntesis de polinucleótidos, evolución dirigida, etc.). Por "producirse de manera natural" se entiende que la secuencia de control de expresión está codificada por una secuencia de ácido nucleico que puede encontrarse en la naturaleza y no ha sido modificada sintéticamente. Sin embargo, no obstante lo anterior, la secuencia de control de expresión heteróloga puede encontrarse de manera natural en adenovirus, pero localizada en una posición normativa con respecto a la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína pIX. Por ejemplo, en una realización, un vector adenovírico deficiente en E1/E4 puede comprender una caja de expresión (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno) posicionada en la región E4 eliminada del genoma adenovírico. En consecuencia, como un resultado de la eliminación de la región E1, el promotor E1A está posicionado directamente más arriba de la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX, de manera tal que la expresión de pIX está regulada por el promotor E1A. El ligado de manera operable de la secuencia de control de expresión heteróloga a la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX puede llevarse a cabo usando cualquier técnica de ADN recombinante conocida en la técnica, tales como las descritas en Sambrook y otros, *supra*.

Preferiblemente, la secuencia de control de expresión heteróloga es un promotor heterólogo. Un "promotor" es una secuencia de ADN que dirige la unión de ARN polimerasa y, en consecuencia, promueve la síntesis de ARN. Cualquier promotor (es decir, tanto aislado de la naturaleza como producido mediante ADN recombinante o técnicas de síntesis) puede usarse de acuerdo con la invención para proporcionar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. Preferiblemente, el promotor es capaz de dirigir la transcripción en una célula eucariótica (de manera deseable mamífera). El funcionamiento del promotor puede ser alterado por la presencia de uno o más potenciadores (por ejemplo, el potenciador temprano inmediato CMV) y/o silenciadores.

Preferiblemente, la invención usa un promotor vírico. Los promotores víricos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, promotores de citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano-inmediato CMV, pro-

5 motores obtenidos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como el promotor de repetición terminal largo del VIH, promotores del virus del sarcoma de Rous (RSV), tal como la repetición terminal larga del RSV, promotores del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), promotores HSV, tal como el promotor Lap2 o el promotor timidina quinasa del herpes (Wagner y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 78, págs. 144-145, (1981), promotores obtenidos de SV40 o virus de Epstein Barr, un promotor vírico adeno-asociado, tal como el promotor p5, y similares. Preferiblemente, el promotor vírico es un promotor p5 del virus adeno-asociado de SEC ID NO: 11.

10 El promotor heterólogo no necesita ser un promotor vírico. Por ejemplo, el promotor heterólogo puede ser un promotor celular, es decir, un promotor que impulsa la expresión de una proteína celular. Los promotores celulares preferidos para uso en la invención dependerán del perfil de expresión deseado para producir la proteína(s) codificada por la secuencia de ácido nucleico. En un aspecto, el promotor celular es, preferiblemente, un promotor constitutivo que actúa en una diversidad de tipos de células. Los promotores constitutivos adecuados pueden impulsar la expresión de genes que codifican factores de transcripción, genes consecutivos o genes estructurales comunes a células eucarióticas. Por ejemplo, el factor de transcripción Ying Yang 1 (YY1) (también denominado como NMP-1, NF-E1, y UCRBP) es un factor de transcripción nuclear omnipresente que es un componente intrínseco de la matriz nuclear (Guo y otros, PNAS, vol. 92, págs. 10525-10530, (1995)). El JEM-1 (también conocido como HGMW y BLZF-1; Tong y otros, Leukemia, vol. 12, (nº. 11), págs. 1733-1740, (1998), y Tong y otros, Genomics, vol. 69, (nº. 3), págs. 380-390, (2000)), un promotor omnipresente, específicamente UbC (Marinovic y otros, J. Biol. Chem., vol. 277, (nº. 19), págs. 16673-16681, (2002)), un promotor de β -actina, tal como el obtenido de pollo, y similares, son apropiados para uso en el procedimiento de la invención.

20 Muchos de los promotores descritos anteriormente son promotores constitutivos. En lugar de ser un promotor constitutivo, el promotor heterólogo puede ser un promotor regulable, es decir, que está sobre-regulado y/o atenuada la regulación en respuesta a señales apropiadas. El uso de una secuencia de control de expresión o de promotor regulable que es particularmente aplicable al desarrollo de vacunas de ADN como proteínas antigénicas, incluyendo antígenos víricos y parásitos, son frecuentemente tóxicos para las líneas de células que complementan. En una realización, las secuencias reguladoras ligadas de manera operable a la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX, incluye componentes del sistema de expresión de tetraciclina, por ejemplo, sitios de operador tet. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX está ligada de manera operable a un promotor que está ligado de manera operable a uno o más sitios de operador tet. Un vector adenovírico que comprende una caja de expresión de este tipo, puede propagarse en una línea de células de complemento, tal como la 293-ORF6 descrita, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 5.994.106 y la Solicitud de Patente Internacional WO 95/34671, la cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína represora tet. Mediante la introducción de la proteína represora tet en la línea de células de complemento, se inhibe la producción de pIX y la propagación se desarrolla sin ninguna toxicidad de la célula asociada. Los sistemas de promotores regulables heterólogos adecuados incluyen igualmente, pero sin limitarse a ellos, el promotor IL-8, el sistema de promotor inducible de metalotionina, el sistema de expresión lacZYA bacteriano, y el sistema T7 polimerasa. Además, pueden usarse promotores que están selectivamente activados en diferentes fases del desarrollo (por ejemplo, los genes globina son transcritos de manera diferencial a partir de promotores asociados a globina en embriones y adultos). La secuencia de promotor heteróloga puede contener por lo menos una secuencia reguladora heteróloga que responde a la regulación mediante un agente exógeno. Las secuencias reguladoras responden preferiblemente a agentes exógenos tales como, pero sin limitarse a ellos, fármacos, hormonas, u otros productos de genes.

45 Como alternativa, la secuencia de control de expresión heteróloga puede ser un potenciador heterólogo. Un potenciador es cualquier secuencia de polinucleótido con actuación *cis* que promueve, induce, o controla de cualquier otra forma (por ejemplo, inhibe) la expresión (preferiblemente, la transcripción) de una o más secuencias de ácido nucleico ligadas de manera operativa. A un potenciador que inhibe la transcripción se le denomina también un "silenciador". El potenciador puede funcionar o bien en una orientación directa o bien inversa con respecto a la secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, desde una posición "más abajo" de la secuencia de ácido nucleico ligada de manera operativa) y sobre una distancia relativamente larga (por ejemplo, varios kilobases (kb)) a partir de una secuencia de ácido nucleico ligada de manera operativa. De acuerdo con ello, el potenciador heterólogo puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que funcione para inducir, promover, o controlar la expresión en cualquier orientación y/o a diversas distancias a partir de la secuencia de ácido nucleico ligada de manera operable. Por el contrario, un promotor operará en una secuencia de manera específica, típicamente en la misma orientación y más arriba de la secuencia de ácido nucleico, y de una manera más localizada.

55 La secuencia de control de expresión heteróloga puede comprender o bien un promotor heterólogo o un potenciador heterólogo, o bien puede construirse una secuencia de control de expresión híbrida que comprenda tanto un promotor heterólogo como un potenciador heterólogo, o porciones funcionales de los mismos. De acuerdo con la invención, una "porción funcional" es cualquier porción de una secuencia de control de expresión que promueva, potencie, o controle de manera medible la expresión (típicamente, la transcripción) de un ácido nucleico ligado de manera operativa. Dicha regulación de la expresión puede medirse mediante la detección de ARN o proteína mediante cualquier técnica adecuada, conociéndose varias de las mismas en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen análisis Northern (véase, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*, y McMaster y Carmichel, PNAS, vol. 74, págs. 4835-4838, (1997)), RT-PCR (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.601.820, y Zaheer y otros, Neurochem. Res., vol. 20, págs. 1457-1463, (1995)), procedimientos de hibridación *in situ* (véanse, por ejemplo, Patentes de EE.UU. 5.760.340 y 5.506.098), técnicas mediadas por anticuerpos (véanse, por ejemplo, Patentes de EE.UU. 4.367.110,

4.452.901, y 6.054.467), y ensayos de promotores que usan sistemas de genes informadores tales como el gen luciferasa (véase, por ejemplo, Taira y otros, *Gene*, vol. 263, págs. 285-292, (2001)). En Sambrook y otros, *supra*, se encuentran detallados otros sistemas de expresión eucarióticos en general.

5 En otra realización de la invención, la secuencia de control de expresión heteróloga puede ser una secuencia de ácido nucleico anti-represora. Un "anti-represor" es una secuencia de ácido nucleico de actuación *cis* que funciona para contrarrestar la expresión del gen, pero que no es en sí misma una secuencia promotora. Puede usarse cualquier secuencia anti-represora adecuada en el contexto de la invención. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico anti-represora se obtiene a partir de, se basa en, o procede de una bacteria o mamífero (véase, por ejemplo, Kawaks y otros, *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, (nº. 5), págs. 553-8, (2003)).

10 Sea cual fuera la secuencia de control de expresión heteróloga elegida, esta preferiblemente des-regula la expresión de la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX del promotor ligado de manera operable a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína pIX en un adenovirus de tipo salvaje. Tal como se ha expuesto en la presente invención, los vectores adenovíricos frecuentemente se hacen deficientes para la replicación mediante la delección de toda o parte de la región E1 del genoma adenovírico. Sin embargo, la delección de la región E1 se ha mostrado
15 que atenúa la regulación de la expresión de pIX, dando como resultado partículas adenovíricas que son inestables a altas temperaturas (es decir, "termolábiles") (véase, por ejemplo, Ghosh-Choudhury y otros, *supra*). Los vectores adenovíricos termolábiles no pueden encapsidar genomas de longitud total (véase, por ejemplo, Caravokyrí y otros, *supra*). Se ha encontrado que la alteración de la expresión de pIX mediante la liberación del gen pIX a partir de sus mecanismos de control de expresión endógenos, produce vectores adenovíricos que son más estables a altas temperaturas (es decir, "termoestables"), en comparación con vectores adenovíricos deficientes en la proteína pIX (por
20 ejemplo, como un resultado de la delección de la región E1). Como tal, la termoestabilidad conferida mediante la restauración de la expresión de pIX incrementa la eficacia del virus rescatado a partir del ADN plásmido. Igualmente, la termoestabilidad confiere estabilidad potenciada de genomas adenovíricos, incrementándose, de esta forma, la capacidad de encapsidación del vector adenovírico.

25 La invención proporciona además un procedimiento para la potenciación de la estabilidad y/o la capacidad de encapsidación de un vector adenovírico. El procedimiento comprende: (a) introducción de un vector adenovírico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX adenovírica ligada de manera operable a una secuencia de control de expresión heteróloga dentro de una célula, y la propagación del vector adenovírico, en el que la estabilidad y/o la capacidad de encapsidación del vector adenovírico está potenciada en comparación con un vector adenovírico que carece de una secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX ligada de manera operable
30 a una secuencia de control de expresión heteróloga. La estabilidad del vector adenovírico puede determinarse usando cualquier procedimiento conocido, tal como el ensayo de termoestabilidad descrito en los Ejemplos. En una realización preferida del procedimiento de la invención, la capacidad de encapsidación del vector adenovírico se potencia de manera tal que es aproximadamente 95% o más (por ejemplo, aproximadamente 95%, aproximadamente 97%, o aproximadamente 98%) de un genoma adenovírico de tipo salvaje correspondiente. Más preferiblemente, la capacidad de encapsidación del vector adenovírico es aproximadamente 99% (por ejemplo, aproximadamente 99%, aproximadamente 99,5%, o aproximadamente 99,8%) o más de un genoma adenovírico de tipo salvaje correspondiente. Lo más preferiblemente, la capacidad de encapsidación del vector adenovírico es aproximadamente 100% o más (por ejemplo, aproximadamente 100,5%, aproximadamente 105%, o aproximadamente 108%) o más de un
40 genoma adenovírico de tipo salvaje correspondiente.

Aunque la estabilidad y/o eficacia de encapsidación del vector adenovírico puede potenciarse mediante el ligamiento de manera operable de una secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX a una secuencia de control de expresión heteróloga, la estabilidad y/o eficacia de encapsidación del vector adenovírico puede potenciarse igualmente mediante la modificación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX, de manera tal que la actividad de la
45 proteína pIX se incrementa en comparación con una proteína pIX codificada por una secuencia de ácido nucleico sin modificar. En esta realización, la secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX está ligada de manera operable a un promotor de pIX de tipo salvaje. Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico se muta de manera tal que la proteína pIX contiene una eliminación, sustitución, o adición de uno o más aminoácidos. La secuencia de ácido nucleico que codifica la pIX puede mutarse de cualquier manera adecuada, siempre y cuando que la actividad de la
50 proteína pIX se incremente en comparación con una proteína pIX codificada por una secuencia de ácido nucleico sin modificar. La actividad de la proteína pIX puede medirse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo los ensayos de viabilidad y estabilidad de virus descritos en los Ejemplos.

El vector adenovírico de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno, el cual está expresado en el mamífero para inducir una respuesta inmune. Un "antígeno" es una molécula que inicia una
55 respuesta inmune en un mamífero. Una "respuesta inmune" puede implicar, por ejemplo, la producción de anticuerpo y/o la activación de células efectoras inmunes. Un antígeno en el contexto de la invención, puede comprender cualquier subunidad de cualquier molécula proteínica, incluyendo una proteína o péptido de origen vírico, bacteriano, parasítico, fúngico, protozoario, prión, celular, o extracelular, que de manera ideal provoque una respuesta inmune en un mamífero, preferiblemente dando lugar a inmunidad protectora. El antígeno puede ser, igualmente, un auto-antígeno, es decir, una proteína autóloga que el cuerpo ha identificado de manera equivocada como un invasor extraño.
60

En una realización, el antígeno es un antígeno vírico. El antígeno puede aislarse a partir de cualquier virus incluyendo, pero sin limitarse a ellos, un virus procedente de cualquiera de las familias víricas siguientes: *Arenaviridae*, *Arterivirus*, *Astroviridae*, *Baculoviridae*, *badanavirus*, *Barnaviridae*, *Bimaviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*, *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Caulimovirus*, *Circoviridae*, *Closterovirus*, *Comoviridae*, *Coronaviridae* (por ejemplo, *Coronavirus*, tal como virus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)), *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Deltavirus*, *Dianthovirus*, *Enamovirus*, *Filoviridae* (por ejemplo, virus de Marburg y virus del Ebola (por ejemplo, cepa del Zaire, Reston, Costa de Marfil, o Sudán)), *Flaviviridae* (por ejemplo, virus de la Hepatitis C, virus 1 del Dengue, virus 2 del Dengue, virus 3 del Dengue, y virus 4 del Dengue), *Hepadnaviridae* (por ejemplo, virus de la Hepatitis B), *Herpesviridae* (por ejemplo, virus del Herpes humano 1, 2, 3, 4, 5, y 6, y Citomegalovirus), *Hypoviridae*, *Iridoviridae*, *Leviviridae*, *Lipothrixviridae*, *Microviridae*, *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de influenza A y B), *Papovaviridae*, *Paramyxoviridae* (por ejemplo, sarampión, parotiditis, y virus sincitial respiratorio humano), *Parvoviridae*, *Picomaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, rinovirus, hepatovirus, y virus aftoso), *Poxviridae* (por ejemplo, virus vaccinia), *Reoviridae* (por ejemplo, rotavirus), *Retroviridae* (por ejemplo, lentivirus, tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y VIH 2), *Rhabdoviridae*, y *Totiviridae*. Preferiblemente, al menos un antígeno del procedimiento de la invención es un antígeno retrovírico. El antígeno retrovírico puede ser, por ejemplo, un antígeno del HIV, tal como la totalidad o parte de las proteínas gag, env, o pol. Cualquier grupo de VIH es apropiado para la selección de antígeno, incluyendo los grupos A, B, C, MN, y similares. Igualmente preferible, al menos un antígeno codificado por el vector adenovírico, es un antígeno de coronavirus, tal como un antígeno del virus SARS. Los antígenos del virus SARS adecuados para el procedimiento de la invención incluyen, por ejemplo, toda o parte de la proteína E, la proteína M, y la proteína espicular del virus SARS. Los antígenos víricos adecuados incluyen también toda o parte de la proteína M del Dengue, la proteína E del Dengue, la D1NS1 del Dengue, la D1NS2 del Dengue, y la D1NS3 del Dengue. Los péptidos antigénicos específicamente mencionados en la presente invención son meramente a modo de ejemplo, puesto que puede usarse cualquier proteína vírica en el contexto de la invención.

El antígeno puede ser un antígeno parásito tal como, pero sin limitarse a ellos, un antígeno *Sporozoon*. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un antígeno *Plasmodian*, tal como todo o parte de una proteína *Circumsporozoita*, una proteína de superficie *Esporozoita*, un antígeno en fase hígado, una proteína asociada a la membrana apical, o una proteína de superficie *Merozoita*.

Como alternativa o además, al menos un antígeno codificado por el vector adenovírico es un antígeno bacteriano. El antígeno puede originarse a partir de cualquier bacterio, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, *Actinomyces*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bdellovibrio*, *Caulobacter*, *Chlamydia*, *Chlorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Halobacterium*, *Heliobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methanobacterium*, *Micrococcus*, *Myobacterium*, *Mycoplasma*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Prochloron*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Phodospirillum*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thiobacillus*, y *Treponema*. En una realización preferida, al menos un antígeno codificado por la secuencia de ácido nucleico es un antígeno *Pseudomonas* o un antígeno *Heliobacter*.

Es de resaltar que no se requiere una proteína bacteriana o vírica intacta, entera, para producir una respuesta inmune. Realmente, la mayoría de los epítomos antigénicos son de tamaño relativamente pequeño y, en consecuencia, pueden ser suficientes fragmentos de proteína para exposición al sistema inmune del mamífero. Además, puede generarse una proteína de fusión entre dos o más epítomos antigénicos de uno o más antígenos. Por ejemplo, todo o parte de la gp120 o gp160 del VIH puede fusionarse con todo o parte de la proteína pol del VIH para generar una respuesta inmune más completa contra el patógeno VIH comparada con la generada por un epítomo único. El suministro de proteínas de fusión mediante vector adenovírico a un mamífero permite la exposición de un sistema inmune a múltiples antígenos y, en consecuencia, hace posible una composición de una única vacuna para proporcionar inmunidad contra múltiples patógenos.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno no está limitada a un tipo de secuencia de ácido nucleico o de ningún origen particular. La secuencia de ácido nucleico puede ser ADN recombinante, puede ser ADN genómico, puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADN de epítomos antigénicos potenciales, o puede generarse de manera sintética. La secuencia de ácido nucleico puede estar presente como parte de una caja de expresión, la cual adicionalmente comprende los elementos genéticos requeridos para la eficaz expresión de la secuencia de ácido nucleico y la producción del antígeno codificado. De manera ideal, la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno está ligada de manera operable a un promotor y a una secuencia de poliadenilación, tal como se describe en la presente invención. Para uso en el procedimiento de la invención, puede seleccionarse un promotor comprobando la compatibilidad de su patrón particular de actividad con el patrón deseado y la proporción de expresión del antígeno(s). Por ejemplo, el vector adenovírico puede comprender dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes antígenos y están ligadas de manera operable a diferentes promotores que muestran distintos perfiles de expresión. Por ejemplo, se selecciona un primer promotor para mediar en un pico inicial de producción de antígeno, cebando, de esta forma, al sistema inmune contra un antígeno codificado. Para impulsar la producción del mismo o diferente antígeno, se selecciona un segundo promotor de manera tal que se producen picos de expresión varios días después de la del primer promotor, "reforzando", de esta forma, el sistema inmune contra el antígeno. Como alternativa, puede construirse un promotor híbrido que combine los aspectos deseables de múltiples promotores. Por ejemplo, un promotor híbrido de CMV-RSV que combine el ímpetu inicial de actividad del promotor de CMV con la proporción de alto mantenimiento de actividad del promotor de RSV es especialmente preferido para uso en muchas realizaciones del procedimiento de la invención. Dado que los antígenos pueden ser tóxicos para las células

eucarióticas, puede ser ventajoso el modificar el promotor a fin de disminuir la actividad en la complementación de líneas de células usadas para propagar el vector adenovírico.

A fin de optimizar la producción de proteína, preferiblemente la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno comprende, además, un sitio de poliadenilación después de la secuencia de codificación de la secuencia de ácido nucleico. Puede usarse cualquier secuencia de poliadenilación adecuada, incluyendo una secuencia optimizada sintética, así como la secuencia de poliadenilación de BGH (Hormona del Crecimiento Bovino), virus polio, TK (Timidina Quinasa), EBV (virus de Epstein Barr), y los papilomavirus, incluyendo papilomavirus humanos y BPV (Virus de Papiloma Bovino). Una secuencia de poliadenilación preferida es la secuencia de poliadenilación SV40 (Virus del Sarcoma Humano 40). Igualmente, preferiblemente todas las señales de transcripción convenientes (y señales de traducción, en los casos apropiados) están correctamente dispuestas, de manera tal que la secuencia de ácido nucleico está convenientemente expresada en las células dentro de las cuales se han introducido. Si se desea, la secuencia de ácido nucleico puede incorporar igualmente sitios de corte y empalme (es decir, sitios aceptores de corte y empalme y donantes de corte y empalme) con el fin de facilitar la producción de ARNm.

Si la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno codifica una proteína o péptido tratada o secretada, o una proteína que actúa intracelularmente, preferiblemente la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno comprende, además, las secuencias apropiadas para tratamiento, secreción, localización intracelular, y similares. La secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno puede estar ligada de manera operable a una secuencia señal, la cual identifica una proteína a la maquinaria celular para la secreción. Las secuencias señal apropiadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, secuencias líder para cadenas pesadas de inmunoglobulina y citocinas (véase, por ejemplo, Ladunga, Currents Opinions in Biotechnology, vol. 11, págs. 13-18, (2000)). Otras modificaciones de proteínas pueden ser requeridas para secretar una proteína a partir de una célula huésped, las cuales pueden determinarse usando técnicas de laboratorio convencionales. La preparación de constructos de expresión que codifican antígenos y secuencias señal están descritas adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 6.500.641. Los procedimientos de secreción de proteínas no secretables están descritos adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. 6.472.176, y la Solicitud de Patente Internacional WO 02/48377.

La proteína del antígeno codificada por la secuencia de ácido nucleico del vector adenovírico puede igualmente modificarse para atacar o incorporar el antígeno sobre la superficie de la célula huésped. A este respecto, el antígeno puede comprender un anclaje de membrana, tal como un anclaje gpi, para conjugación sobre la superficie de la célula. Puede fusionarse al antígeno un dominio transmembrana para incorporar una terminación de la proteína del antígeno dentro de la membrana de la célula. Otras estrategias para presentar péptidos sobre una superficie de célula son conocidas en la técnica y apropiadas para uso en el contexto de la invención.

En el procedimiento de la invención, el vector adenovírico se administra preferiblemente a un mamífero (por ejemplo, un humano), en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno está expresada para inducir una respuesta inmune contra el antígeno. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune mediada por célula, o, de manera deseable, una combinación de inmunidad humoral y mediada por célula. De manera ideal, la respuesta inmune proporciona protección tras la subsiguiente exposición con el patógeno que comprende el antígeno. Sin embargo, no se requiere inmunidad protectora en el contexto de la invención. La administración del vector adenovírico de la invención puede usarse igualmente para crear tolerancia inmune para disminuir la severidad de, por ejemplo, enfermedades autoinmunes tales como lupus, psoriasis, y artritis. El procedimiento de la invención puede usarse además para la producción y recolección de anticuerpos.

Para potenciar la respuesta inmune generada contra el antígeno, el vector adenovírico, o un gen diferente que transfiere el vector administrado al mamífero, puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un estimulador inmune, tal como una citocina, una quimiocina, o un acompañante. La citocina incluye, por ejemplo, Factor Estimulante de Colonias Macrófagas (por ejemplo, GM-CSF), Interferón Alfa (IFN- α), Interferón Beta (IFN- β), Interferón gamma (IFN- γ), Interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, e IL-18), la familia TNF de proteínas, Molécula de Adhesión Intercelular-1 (ICAM-1), Antígeno-3 Asociado a la Función Linfocito (LFA-3), B7-1, B7-2, ligando tirosina quinasa 3 relacionado con FMS (Flt3L), péptido intestinal vasoactivo (VIP), y ligando CD40. Las quimiocinas incluyen, por ejemplo, quimiocina-1 de atracción de Célula B (BCA-1), Fractalcina, proteína de Actividad Estimuladora del Crecimiento de Melanoma (MGSA), quimiocina 1 de Hemofiltrado CC (HCC-1), Interleuquina 8 (IL8), quimioatrazador alfa de célula T estimulado por Interferón (I-TAC), Linfotactina, Proteína Quimiotáctica Monocita 1 (MCP-1), Proteína Quimiotáctica Monocita 2 (MCP-2), Proteína Quimiotáctica Monocita 3 (MCP-3), Proteína Quimiotáctica Monocita 4 (MCP-4), Quimiocina obtenida de Macrófago (MDC), una proteína inflamatoria macrófaga (MIP), Factor de Plaqueta 4 (PF4), RANTES, BRAK, eotaxina, éxodo 1-3, y similares. Los acompañantes incluyen, por ejemplo, las proteínas de choque térmico Hsp170, Hsc70, y Hsp40. Las citocinas y quimiocinas se encuentran generalmente descritas en la técnica, incluyendo el catálogo de Invivogen (2002), San Diego, CA.

La invención puede comprender la administración de vectores adenovíricos múltiples al mamífero, comprendiendo cada vector adenovírico una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos y/o inmunomoduladores. Si el vector adenovírico comprende más de una secuencia de ácido nucleico exógena, pueden ligarse de manera operable dos o más secuencias de ácido nucleico al mismo promotor (por ejemplo, para formar una secuencia bicistrónica), pueden ligarse de modo operable dos o más secuencias de ácido nucleico para separar promotores

del mismo tipo (por ejemplo, el promotor CMV), o pueden ligarse de modo operable dos o más secuencias de ácido nucleico para separar diferentes promotores (por ejemplo, el promotor CMV y el promotor β -actina). Los vectores adenoviricos múltiples pueden incluir dos o más constructos de vector adenovirico que codifican diferentes antígenos, diferentes epítomos de la misma proteína antigénica, la misma proteína antigénica obtenida de diferentes especies o grupos de microorganismos, antígenos procedentes de microorganismos diferentes, y similares. Es de señalar que, en algunas realizaciones, la administración de un "cóctel" de vectores adenoviricos que codifican diferentes antígenos o diferentes epítomos del mismo antígeno, puede proporcionar una respuesta inmune más eficaz que la administración de un único clon de vector adenovirico a un mamífero.

Igualmente, la administración del vector adenovirico que codifica un antígeno puede ser un componente de un régimen multietapa para la inducción de una respuesta inmune en un mamífero. En particular, el procedimiento de la invención puede representar una cola de un régimen de inmunización de cebado y de refuerzo. En consecuencia, el procedimiento de la invención puede comprender la administración al mamífero de un vector de transferencia de gen de cebado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un antígeno antes de la administración del vector adenovirico. El antígeno codificado por el vector de transferencia de gen de cebado puede ser el mismo o diferente del antígeno del vector adenovirico. A continuación, el vector adenovirico se administra para reforzar la respuesta inmune a un patógeno dado. Puede suministrarse más de una composición de refuerzo que comprende el vector adenovirico en cualquier intervalo de tiempo adecuado (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 16 semanas, o más después del cebado), para mantener la inmunidad.

Puede usarse cualquier vector de transferencia de gen como un vector de transferencia de gen de cebado, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, un plásmido, un retrovirus, un virus adeno-asociado, un virus vacuna, un virus herpes, o un adenovirus. De manera ideal, el vector de transferencia de gen de cebado es un plásmido o un vector adenovirico. Como alternativa, puede cebarse o reforzarse una respuesta inmune mediante la administración del propio antígeno, por ejemplo, una proteína antigénica, patógeno inactivado, y similares.

Puede usarse cualquier vía de administración para suministrar el vector adenovirico al mamífero. Realmente, aunque puede usarse más de una vía para administrar el vector adenovirico, una vía particular puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. Preferiblemente, el vector adenovirico se administra vía inyección intramuscular. Igualmente, puede aplicarse una dosis de vector adenovirico o instilarse dentro de cavidades corporales, absorberse a través de la piel (por ejemplo, vía parche transdérmico), inhalado, ingerido, aplicado tópicamente al tejido, o administrado parenteralmente vía, por ejemplo, de administración intravenosa, peritoneal, o intraarterial.

El vector adenovirico puede administrarse en o sobre un dispositivo que permita la liberación controlada o sostenida, tal como una esponja, mallas biocompatibles, depósito mecánico, o implante mecánico. Los implantes (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. 5.443.505), dispositivos (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. 4.863.457), tal como un dispositivo implantable, por ejemplo, un depósito mecánico o un implante o un dispositivo que comprende una composición polimera, son particularmente útiles para la administración del vector adenovirico. Igualmente, el vector adenovirico puede administrarse en la forma de formulaciones de liberación sostenida (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.378.475) que comprenden, por ejemplo, espuma de gel, ácido hialurónico, gelatina, sulfato de condroitina, un polifosfoéster, tal como bis-2-hidroxietil-tereftalato (BHET) y/o un ácido poliláctico-glicólico.

La dosis de vector adenovirico administrada al mamífero dependerá de un cierto número de factores, incluyendo el tamaño de un tejido diana, la extensión de cualquier efecto secundario, la vía particular de administración, y similares. La dosis ideal comprende una "cantidad eficaz" de vector adenovirico, es decir, una dosis de vector adenovirico que provoque una respuesta inmune deseada en el mamífero. La respuesta inmune deseada puede implicar la producción de anticuerpos, protección tras la subsiguiente exposición, inmuno tolerancia, activación de células inmunes, y similares. De manera deseable, una dosis única de vector adenovirico comprende al menos aproximadamente 1×10^5 partículas (la cual se denomina igualmente como unidades de partículas) del vector adenovirico. Preferiblemente, la dosis es al menos aproximadamente de 1×10^6 partículas (por ejemplo, aproximadamente 1×10^6 - 1×10^{12} partículas), más preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^7 partículas, más preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^8 partículas (por ejemplo, aproximadamente 1×10^8 - 1×10^{11} partículas), y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^9 partículas (por ejemplo, aproximadamente 1×10^9 - 1×10^{10} partículas) del vector adenovirico. Como alternativa, la dosis comprende no más de aproximadamente 1×10^{14} partículas, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{13} partículas, incluso más preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{12} partículas, incluso más preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{11} partículas, y lo más preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{10} partículas (por ejemplo, no más de aproximadamente 1×10^9 partículas). En otras palabras, una dosis única de vector adenovirico puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 1×10^6 unidades de partículas (up), 2×10^6 up, 4×10^6 up, 1×10^7 up, 2×10^7 up, 4×10^7 up, 1×10^8 up, 2×10^8 up, 4×10^8 up, 1×10^9 up, 2×10^9 up, 4×10^9 up, 1×10^{10} up, 2×10^{10} up, 4×10^{10} up, 1×10^{11} up, 2×10^{11} up, 4×10^{11} up, 1×10^{12} up, 2×10^{12} up, o 4×10^{12} up del vector adenovirico.

De manera deseable, el vector adenovirico se administra en una composición, preferiblemente una composición aceptable fisiológicamente (por ejemplo, aceptable farmacéuticamente), la cual comprende un vehículo, preferiblemente un vehículo aceptable fisiológicamente (por ejemplo, farmacéuticamente) y el vector(es) adenovirico. Puede usarse cualquier vehículo adecuado dentro del contexto de la invención, y dichos vehículos son bien conocidos en la

técnica. La elección del vehículo estará determinada, en parte, por el sitio particular al cual ha de administrarse la composición y el procedimiento particular usado para administrar la composición. De manera ideal, en el contexto de vectores adenovíricos, preferiblemente la composición está libre de adenovirus competentes para replicación.

5 Las formulaciones adecuadas para la composición incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones estériles isotónicas, las cuales pueden contener antioxidantes, tampones, y bacterioestáticos, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizadores, agentes espesantes, estabilizadores, y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases sellados uni-dosis o multi-dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado criodesecado (liofilizado) que requiera únicamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y suspen-
10 siones extemporáneas a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo previamente descrito. Preferiblemente, el vehículo es una solución salina tamponada. Más preferiblemente, el vector de expresión para uso en el procedimiento de la invención se administra en una composición formulada para proteger al vector de expresión de daños antes de la administración. Por ejemplo, la composición puede formularse para reducir pérdidas del vector adenovírico sobre los dispositivos usados para preparar, almacenar, o administrar el vector de expresión, tales como artículos de vidrio, jeringuillas, o agujas. La composición puede formularse para disminuir la sensibilidad a la luz y/o la sensibilidad a la temperatura del vector de expresión. A tal fin, la composición comprende preferiblemente un vehículo líquido aceptable farmacéuticamente, tal como, por ejemplo, los descritos anteriormente, y un agente esta-
15 bilizante seleccionado entre el grupo que consiste en polisorbato 80, L-arginina, polivinilpirrolidona, trehalosa, y combinaciones de los mismos. El uso de una combinación de este tipo ampliará la vida media del vector, facilita la administración, e incrementa la eficacia del procedimiento de la invención. Las formulaciones para composiciones que contienen vector adenovírico se encuentran descritas además, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 6.225.289, 6.514.943, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2003/4153065 A1, y la Solicitud de Pa-
20 tente Internacional WO 00/34444. Igualmente, puede formularse una composición para potenciar la eficacia de transducción. Además, un experto normal en la técnica apreciará que el vector adenovírico puede presentarse en una composición con otros agentes terapéuticos o biológicamente activos. Por ejemplo, factores que controlan la inflamación, tal como ibuprofeno o esteroides, pueden ser parte de la composición para reducir el hinchamiento e inflamación asociados con la administración *in vivo* del vector vírico. Pueden administrarse estimuladores del sistema inmune para potenciar cualquier respuesta inmune al antígeno. Pueden estar presentes antibióticos, por ejemplo, microbicidas y fungicidas, para tratar la infección existente y/o reducir el riesgo de futura infección, tal como infección
25 asociada con procedimientos de transferencia de genes.

La construcción de vectores adenovíricos es bien conocida en la técnica. Los vectores adenovíricos pueden cons-
30 truirse y/o purificarse usando los procedimientos establecidos, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 5.965.358, 6.168.941, 6.329.200, 6.383.795, 6.440.728, 6.447.995, y 6.475.757, y las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de EE.UU. Nos. 2003/0203469 A1 y 2003/0203480 A1, y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 98/53087, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, WO 00/12765, WO 01/77304, y WO 02/29388, así como otras referen-
35 cias identificadas en la presente invención. Un vector adenovírico deficiente para replicación puede propagarse en una línea de células de complementación, la cual complementa las funciones del gen para el cual el vector adenovírico es deficiente. De manera deseable, la línea de células de complementación comprende, integrada dentro del genoma celular, secuencias de ácido nucleico adenovírico que codifican funciones del gen requeridas para la propa-
40 gación adenovírica. La fuente de las secuencias de ácido nucleico adenovírico en la línea de células de complementación puede ser un adenovirus del mismo subgrupo y/o serotipo del vector adenovírico. Por ejemplo, un vector adenovírico del serotipo 35 deficiente en E1 puede propagarse en una línea de células de complementación que comprende las secuencias de codificación de E1 de un adenovirus del serotipo 35. Preferiblemente, la línea de células de complementación, la cual permite la propagación de un vector adenovírico deficiente para replicación de la inven-
45 ción, complementa específicamente aquellas funciones que están perdidas del vector adenovírico deficiente para replicación de interés. Preferiblemente, una línea de células de este tipo contiene el gen(es) de complementación de una manera no solapada con el fin de minimizar, sino eliminar, la posibilidad de recombinación del vector proporcionando un vector adenovírico competente para replicación, tal como se divulga en la Patente de EE.UU. 5.994.106. Sin embargo, el genoma celular no necesita comprender secuencias de ácido nucleico, cuyos productos del gen
50 complementen todas las deficiencias de un vector adenovírico deficiente para la replicación. Una o más funciones del gen esenciales para la replicación que faltan en un vector adenovírico deficiente para la replicación, pueden ser suministradas por un virus ayudante, por ejemplo, un vector adenovírico que suministra en forma *trans* una o más funciones del gen esenciales requeridas para la replicación del vector adenovírico deseado. El virus ayudante está frecuentemente manipulado genéticamente para prevenir la encapsidación de virus ayudantes infecciosos. Por
55 ejemplo, una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1 del genoma adenovírico son proporcionadas por la célula, en tanto que una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1 del genoma adenovírico son proporcionadas por un virus ayudante.

Igualmente, es posible propagar vectores adenovíricos del no subgrupo C en líneas de células de complementación
60 diseñadas para vectores adenovíricos del grupo C deficientes para replicación. Realmente, se ha descubierto que los vectores adenovíricos del no subgrupo C deficientes para replicación pueden propagarse en líneas de células de complementación generadas usando secuencias de codificación de adenovirus del subgrupo C. Este descubrimiento fue inesperado a la vista de las diferencias substanciales entre los adenovirus del no subgrupo C y los adenovirus

del subgrupo C, tal como se ejemplifica por la relativamente pequeña cantidad de similitud entre productos de genes E1A y E1B de adenovirus del no subgrupo C y adenovirus del subgrupo C.

A este respecto, la invención proporciona un procedimiento de producción de un vector adenovirico. El procedimiento comprende la introducción de un vector adenovirico (por ejemplo, un vector adenovirico del serotipo 41 o un vector adenovirico del serotipo 35) dentro de una célula. El vector adenovirico comprende un genoma adenovirico deficiente en una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1A del genoma adenovirico y una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1B del genoma adenovirico que codifica la proteína E1B de 55K. El vector adenovirico puede comprender además deficiencias tales como las descritas en la presente invención (por ejemplo, deficiencias en una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E4). Preferiblemente, el vector adenovirico es deficiente en todas las funciones del gen esenciales de las regiones E1A y E1B del genoma adenovirico. Las secuencias que codifican la región E1A y E1B del adenovirus del serotipo 35 y del serotipo 41 son conocidas en la técnica y pueden ser eliminadas o mutadas para interrumpir el funcionamiento de los productos de genes codificados. Por ejemplo, la secuencia de codificación de E1B de 55K del adenovirus del serotipo 35 está localizada aproximadamente a 1916-3400 nucleótidos del genoma adenovirico del serotipo 35. La secuencia del genoma adenovirico del serotipo 41 se encuentra disponible en GenBank como No. de Acceso M18289. La secuencia de ácido nucleico de codificación de la proteína E1B de 55K está localizada aproximadamente a 1731-3149 nucleótidos del genoma adenovirico del serotipo 41.

La célula del procedimiento de la invención comprende una secuencia de ácido nucleico adenovirica del subgrupo C que codifica la una o más funciones del gen esenciales de la región E1 que son deficientes en el vector adenovirico (por ejemplo, la célula produce los productos del gen E1A adenovirico del subgrupo C esenciales y al menos la proteína de 55K codificada por la E1B que no es producida por el vector adenovirico), así como una secuencia de ácido nucleico adenovirica del subgrupo C que codifica funciones del gen esenciales de otras regiones que son deficientes en el vector adenovirico. La célula comprende además el marco de lectura abierto 6 (ORF6) de una región E4 adenovirica del subgrupo C. Un ejemplo de línea de células apropiada para uso en el procedimiento de la invención es una línea de células 293 que comprende el ORF6 de E4 adenovirico, tal como la línea de células 293-ORF6 descrita por Brough y otros, en *Journal of Virology*, vol. 70, (nº. 9), págs. 6497-6501, (1996). Como alternativa o además, la célula comprende el ORF3 de una región E4 adenovirica del subgrupo C. Es de resaltar que las funciones del gen esenciales no necesitan estar codificadas por una única secuencia de ácido nucleico, pero pueden estar codificadas por múltiples secuencias de ácido nucleico que trabajan en común para suministrar las funciones requeridas del gen esenciales para replicación. Igualmente, pueden proporcionarse una o más funciones del gen esenciales para replicación en forma *trans* mediante otro vector de transferencia del gen, por ejemplo, un plásmido o virus ayudante. La célula del procedimiento de la invención no comprende secuencias de ácido nucleico del no subgrupo C que codifiquen alguna o todas las funciones del gen esenciales deficientes en el vector adenovirico. El procedimiento comprende además la propagación del vector adenovirico, el cual puede aislarse y formularse en una composición para administración a un mamífero.

Aunque el procedimiento de producción de un vector adenovirico está descrito en la presente invención con respecto de vectores adenoviricos del serotipo 35 y vectores adenoviricos del serotipo 41, una célula que produzca productos del gen del ORF6 (y/o ORF3) de E1A, E1B, y E4 del subgrupo C (preferiblemente del serotipo 5), puede soportar la replicación de vectores adenoviricos de cualquier subgrupo (subgrupo A, subgrupo B, subgrupo C, subgrupo D, subgrupo E, y subgrupo F) que comprenda deficiencias en las regiones E1A y, opcionalmente E1B, del genoma adenovirico. El uso de un sistema que comprende vectores adenoviricos del no subgrupo C y células que comprenden secuencias de ácido nucleico adenovirico del subgrupo C disminuye la probabilidad de producir stocks de vector adenovirico que comprende la contaminación de adenovirus competentes para replicación (RCA).

Igualmente, la invención proporciona una composición, preferiblemente una composición farmacéutica, que comprende un vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35 que comprende un genoma adenovirico deficiente en una o más funciones del gen esenciales para replicación de la región E1A del genoma adenovirico y la región E1B del genoma adenovirico que codifica la proteína E1B de 55K. La composición comprende además un vehículo (por ejemplo, un vehículo aceptable farmacéuticamente o fisiológicamente). De manera ideal, la composición comprende al menos aproximadamente 1×10^5 partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35 intactas (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^5 - 1×10^{12} partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35), al menos aproximadamente 1×10^6 partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35 (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^6 - 1×10^{11} partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35, preferiblemente al menos aproximadamente 1×10^7 partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35), o al menos aproximadamente 1×10^8 partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35 (por ejemplo, al menos aproximadamente 1×10^8 - 1×10^{10} partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35, preferiblemente aproximadamente 1×10^9 partículas de vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35). El vector adenovirico del serotipo 41 o del serotipo 35 deficiente para replicación puede comprender cualquiera de las características descritas anteriormente con respecto a vectores adenoviricos, incluyendo deficiencias en las funciones esenciales para replicación codificadas por otras regiones del genoma adenovirico. Los procedimientos de generación de vectores adenoviricos del no subgrupo C están descritos además en las Patentes de EE.UU. 5.837.511 y 5.849.561, y las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 97/12986 y WO 98/53087.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, no deberían considerarse en ningún modo limitativos de su ámbito.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la generación de un vector adenovirico eliminada la E1 basado en un adenovirus del subgrupo F.

Se construyó el genoma completo de un vector adenovirico del serotipo 41 (Ad41) deseado se construyó en forma de un plásmido único. En primer lugar, se construyó el genoma adenovirico de tipo salvaje de Ad41 de longitud total en forma de plásmido. El genoma adenovirico de Ad41 de tipo salvaje se recombinó dentro de un plásmido pequeño mediante el procedimiento AdRescue. En resumen, el plásmido pequeño (es decir, el "plásmido receptor"), pAd41RSQ.BN, se construyó mediante diversas etapas de sub-clonación. Las secuencias del genoma Ad41 correspondientes a las primeras 405 bp del genoma adenovirico Ad41 de tipo salvaje se amplificaron mediante reacción de cadena de la polimerasa (PCR) y clonado con TOPO (Invitrogen) dentro de pCR2.1TOPO para crear pCR2.1TOPO.Ad41Izquierdo. El extremo izquierdo del genoma adenovirico Ad41 se subclonó mediante clonación por digestión de restricción XhoI dentro de pKSII para crear el plásmido pKSIIAd41(1-405)Izquierdo. El fragmento EcoRI/PmeI procedente de pKSIIAd35(1-4(1-446)Izquierdo.Cos (véase Ejemplo 2) conteniendo un sitio lambda cos y lac Iq, se subclonó dentro de pKSIIAd41(1-405)Izquierdo digerido con EcoTI/PmeI, para crear el plásmido pKSII-Ad41(1-405)Izquierdo.IqCos. Las secuencias genómicas de Ad41 correspondientes al extremo terminal derecho de 440 bp se amplificaron mediante PCR, se clonó con TOPO dentro de pCR2.1TOPO y se subclonó mediante digestión de restricción XbaI dentro de pKSIIAd41(1-405)Izquierdo.IqCos para crear el plásmido pKSIIAd41(1-405)Izquierdo.IqCos.Ad41(440bp)Derecho. A continuación, se clonó una caja de selección positiva/negativa, BN (descrita por McVey, *Journal of Virology*, vol. 76, págs. 3670-3677, (2002)), entre las secuencias genómicas del extremo Ad41 izquierdo y las secuencias genómicas del extremo Derecho en el sitio Sall para generar pKSAd41RSQ.BN. Finalmente, se reemplazó la estructura principal del plásmido pBluescript con un origen de replicación de ADN p15A y la estructura principal del plásmido de resistencia a la kanamicina para generar el pAd41RSQ.BN. El genoma de longitud total de tipo salvaje de Ad35 se rescató dentro de la forma plásmida mediante recombinación de homólogos con pAd41RSQ.BN. Los *E. coli* Rec⁺ se co-transformaron con ADN de tipo salvaje de Ad41 y pAd41RSQ.BN linealizado con SwaI. Los plásmidos recombinantes con el genoma Ad41 de longitud completa reemplazando la caja de selección BN, se identificaron mediante selección de fármaco de bacterias y análisis de enzima de restricción de ADN plásmido miniprep. Se identificaron dos plásmidos, pAC41-16 y pAC41-13B. Las células 293-ORF6 se transfectaron con estos plásmidos. Se observó efecto citopático (cpe), indicativo de propagación vírica, 6 días después de la transfección. La pasada del lisado de transfección dio como resultado en cpe de células 293-ORF6 recientes de una manera dependiente de la dosis. El análisis por PCR verificó la presencia del vector adenovirico Ad341 y la ausencia de secuencias de nucleótidos del vector adenovirico del serotipo 5 (Ad5) en los vectores adenoviricos resultantes. La transfección de células 293 con pAC41-16 y pAC41-13B no dio como resultado pce.

Para construir el genoma completo de un adenovector Ad41 eliminada la E1 que expresó la proteína fluorescente verde (GFP), se recombinó pAC41-13B con plásmidos lanzadera As41, los cuales contienen 5058 bp lo más a la izquierda de Ad41 y la caja de selección BN se insertó junto a la unión de delección de los nucleótidos 361-3164. El plásmido base resultante, pAC41-13BE1 (BNot), se recombinó en *E. coli* con un plásmido lanzadera Ad41, específicamente el pAD41E1(GFP)dpme que contiene, en lugar de la caja de expresión BN, una caja de expresión polyA promotor-potenciador de CMV-GFP-hormona del crecimiento bovino (BGH). El plásmido del genoma adenovector eliminada la E1 (que carece de los nucleótidos 360 a 31649) de Ad41 resultante, pAC41-13B1(f), se digirió con PmeI y se transfectó en células 293-ORF6 (descritas, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional WO 95/34671 y por Brough y otros, en *Journal of Virology*, vol. 70, (nº. 9), págs. 6497-6501, (1996)). Las agrupaciones de células positivas a GFP fueron evidentes 5 días después de la transfección. La pasada del lisado de células transfectadas sobre células 293-ORF6 recientes dio como resultado la aparición de muchas agrupaciones de células positivas a GFP, de acuerdo con la aparición con la formación de placas de adenovirus tempranas. Las posteriores pasadas del lisado de infección por células 293-ORF6 recientes dio como resultado un gran número de células positivas a GFP individuales 24 horas después de la infección y muchas agrupaciones de células positivas a GFP 5 días después de la infección. La presencia del vector adenovirico Ad41 se confirmó mediante PCR, y la ausencia de secuencias de ácido nucleico Ad5 se confirmó mediante PCR.

Este ejemplo ilustra un procedimiento de construcción de un vector adenovirico, del subgrupo F, serotipo 41, deficiente en todas las funciones del gen esenciales de la región E1 del genoma adenovirico. El vector adenovirico se propagó en células 293-ORF6 para crear un stock de vectores adenoviricos Ad41.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la generación de un vector adenovirico eliminada la E1 basado en un adenovirus del subgrupo B.

El genoma completo de un vector adenovirico del serotipo 35 (Ad35) deseado se construyó en forma de un plásmido único. En primer lugar, se construyó el genoma adenovirico de tipo salvaje de Ad35 de longitud total en forma de

plásmido. El genoma adenovirico de Ad35 de tipo salvaje se recombinó dentro de un plásmido pequeño mediante el procedimiento AdRescue. En resumen, el plásmido pequeño (es decir, el "plásmido receptor"), pAd35RSQ.BN, se construyó mediante diversas etapas de sub-clonación. Las secuencias genómicas de Ad35 correspondientes a las primeras 446 bp del genoma adenovirico Ad35 de tipo salvaje se amplificaron mediante PCR y clonado con TOPO (Invitrogen) dentro de pCR2.1TOPO para crear pCR2.1TOPO.Ad35Izquierdo. El extremo izquierdo de Ad35 y la secuencia genómica se subclonaron mediante clonación de digestión-restricción XhoI dentro de pKSII para crear el plásmido pKSIIAd35(1-446)Izquierdo. El fragmento AscI procedente de la serie pACE de GenVec de plásmidos (McVey y otros, *Journal of Virology*, vol. 76, (nº. 8), pág. 3670, (2002)) conteniendo un sitio lambda cos y lac Iq, se subclonó dentro de pKSIIAd35(1-446)Izquierdo digerido con AscI/PacI, para obtener el plásmido pKSIIAd35(1-446)Izquierdo.lqCos. Las secuencias genómicas de Ad35 correspondientes al extremo terminal derecho de 440 bp se amplificaron mediante PCR y subclonaron mediante digestión-restricción XbaI dentro de pKSIIAd35(1-446)Izquierdo.lqCos para crear el plásmido pKSIIAd35(1-446)Izquierdo.lqCos.Ad35(440bp)Derecho. A continuación, se clonó la caja de selección BN entre las secuencias del genoma Ad35 Izquierdo y derecho junto al sitio Sall para generar pKSAd35RSQ.BN. Finalmente, se reemplazó la estructura principal del plásmido de resistencia a la kanamicina para obtener el pAd35RSQ.BN. El genoma de Ad35 de longitud total de tipo salvaje se rescató dentro de la forma plásmida mediante recombinación de homólogos con pAd35RSQ.BN. Los *E. coli* Rec⁺ se co-transformaron con ADN de tipo salvaje de Ad35 y pAd35RSQ.BN linealizado con Swal. Los plásmidos recombinantes con el genoma Ad35 de longitud completa reemplazando la caja de selección BN, se identificaron mediante selección de fármaco de bacterias y análisis de enzima de restricción de ADN plásmido miniprep. Dicho plásmido se identificó como pAC35-6. La células 293-ORF6 se transfectaron con este plásmido, observándose efecto citopático (cpe) 2 días después de la transfección. La pasada del lisado de transfección dio como resultado el cpe de células 293-ORF6 recientes de una manera dependiente de la dosis. El análisis por PCR verificó la presencia del vector adenovirico Ad35 y la ausencia de ADN de Ad5.

Se construyó un plásmido conteniendo el genoma completo de un vector adenovirico Ad35 eliminada la E1 que expresó la proteína fluorescente verde (GFP), pAC35-6E1(f) mediante procedimientos similares al descrito en el Ejemplo 1. El plásmido, conteniendo una delección de las secuencias del nucleótido Ad35 447 a 3417, se digirió con PmeI y se transfectó dentro de células 293-ORF6. Las agrupaciones de células positivas a GFP fueron evidentes a los 3 días después de la transfección. La pasada del lisado de células transfectadas sobre 1×10^6 células 293-ORF6 recientes dio como resultado la transducción de las células mediante GFP y la aparición de citopatosis de una manera dependiente de la dosis. La infección con 50 μ l de lisado de transfección dio como resultado cerca de un 100% de células positivas a GFP y aproximadamente 70% de las células produjeron un efecto citopático aproximadamente 24 después de la infección. Esto es compatible con el lisado de transfección que tiene un título infeccioso de al menos 2×10^7 unidades de transducción de GFP por ml, correspondiente a una multiplicidad de infección de 1 unidad de transducción de GFP por célula. La infección con 450 μ l dio como resultado un 100% de células positivas a GFP y aproximadamente 95% de las células produjeron un efecto citopático a las 24 horas después de la infección. La presencia del vector adenovirico Ad35 se confirmó mediante PCR, y la ausencia de ADN de Ad5 se confirmó mediante PCR.

Este ejemplo ilustra un procedimiento de construcción de un vector adenovirico, del subgrupo B, serotipo 35, deficiente en todas las funciones del gen esenciales de la región E1 del genoma adenovirico. El vector adenovirico se propagó en células 293-ORF6 para crear un stock de vectores adenoviricos Ad35.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la generación de un vector adenovirico eliminada la E1/E3 basado en un adenovirus del subgrupo B.

El Ad35 (GenBank Acceso #AY1284640) tiene cinco sitios XbaI en los nucleótidos 23698, 27240, 27924, 28735 y 29726. Mediante digestión con XbaI parcial de Ad35, ligamiento y encapsidación *in vitro* de pAC35E1 ("Caja BN", expuesta anteriormente), se generó una delección de E3 (XbaI) en el virus Ad35 que abarca 2486 bp de secuencias contenidas entre los nucleótidos 27241 y 29726. Esta delección por XbaI de E3 elimina secuencias de de ácido nucleico que codifican las proteínas 15K, 18,5K, y 20,3K de E3. La caja BN en la región E1 se reemplazó con una caja de expresión que contiene un promotor CMV que impulsa la expresión de gp140dCFI_{dv12}(B) de VIH para crear pAC35E1(RL.CMVint.gp140B.SV40)E3(Xba). Las células 293-ORF6 se transfectaron con este plásmido y se observó un efecto citopático a la primera pasada después de la transfección. El vector Ad35gp140(B).E3(Xba) se expandió sobre una pasada adicional y la presencia del vector se confirmó mediante PCR y análisis de transferencia de Western de la expresión gp140(B). La delección de las regiones E1 y E3 se verificó mediante análisis por PCR que fueron específicos tanto para el transgen como para las delecciones. El lisado de virus de célula procedente de la segunda pasada después de la transfección se usó para inocular una placa reciente de 293 células. Los extractos de proteínas se prepararon a partir de las células infectadas a las 24 horas después de la infección, se electroforesaron mediante un gel SDS-PAGE al 7,5%, se mancharon en una membrana de PVDF, y se sondaron con un anticuerpo anti-VIH. La proteína gp140 se detectó en los extractos de proteína.

Este ejemplo ilustra un procedimiento de construcción de un vector adenovirico del subgrupo B, deficiente en todas las funciones del gen esenciales de la región E1 del genoma adenovirico y deficiente en la región E3 del genoma adenovirico.

Ejemplo 4

- 5 Este ejemplo demuestra la generación de un vector adenovirico eliminada la E1/E3 basado en un adenovirus del subgrupo B.

Se generaron dos deleciones de la región E4 del genoma adenovirico Ad35, cada una en combinación con una deleción de la región E1 del genoma adenovirico Ad35. A este respecto, una caja de expresión que comprende un promotor CMV que controla la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto gp140dCFIdV12(B), luciferasa, fosfatasa alcalina secretada, beta-galactosidasa, como beta-glucuronidasa, se insertó dentro de una deleción de la región E1 del genoma Ad35 tal como se describe en la presente invención. La primera deleción E4, Ad35E4(dORF26), se construyó mediante la generación de una deleción de 1749 bp a partir de un sitio endonucleasa de restricción NruI junto al nucleótido 32011 (véase GenBank Acceso #AY128640), que está localizado en las secuencias de no codificación entre el gen de fibra y la región E4, a un sitio SmaI junto al nucleótido 33760 (véase GenBank Acceso#AY128640), que está localizado dentro de las secuencias de codificación para la proteína Ad35 E4 ORF2. La proteína Ad35 ORF2 no comparte homologías con la proteína Ad5 E4 ORF2. La segunda deleción E4, Ad35E4(dORF1-6), se construyó mediante la generación de una deleción diana de 2408 bp, lo cual eliminó todas las secuencias de codificación de E4 desde el sitio NruI descrito anteriormente hasta la primera adenina (A) en el nucleótido 34419 (véase GenBank Acceso #AY128640), en el codón ATG del Ad35 E4 ORF1.

- 20 Los plásmidos genómicos del vector Ad35 que contienen las deleciones E1 y E4 se transfectaron dentro de células 293-ORF6. La posterior pasada en serie de los lisados de transfección demostró que los vectores adenoviricos eliminadas las E1/E4 fueron viables independientemente de la deleción de E4 y el transgen expresado a partir de la región E1. Mediante una o dos pasadas después de la transfección, el 100% de las células experimentó un efecto citopático, inducido por el crecimiento y difusión de los vectores Ad35 eliminadas la E1/E4. La presencia de cada vector se determinó mediante análisis por PCR. La deleción de las regiones E1 y E4 en cada vector se verificó mediante análisis por PCR, el cual identificó igualmente de manera positiva la presencia del transgen.

Este ejemplo ilustra un procedimiento de construcción de un vector adenovirico del subgrupo B, deficiente en todas las funciones del gen esenciales de la región E1 y la región E4 del genoma adenovirico.

Ejemplo 5

- 30 Este ejemplo demuestra la generación de un vector adenovirico eliminada la E1 basado en un adenovirus del subgrupo B que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX ligada de manera operable a un promotor heterólogo.

Los vectores de Ad35 eliminada la E1 que codifican β -galactosidasa (LacZ), β -glucuronidasa (GUS), o la proteína de envoltura de VIH gp140dCFIdV12(B) (gp140B) cada una de ellas ligada de manera operable a un promotor CMV, se construyeron tal como se ha descrito anteriormente y se propagaron en células 293-ORF6. La liberación con éxito de vectores Ad35 se define como la inducción de efectos citopáticos (cpe) dentro de las 48 horas de la primera pasada después de la transfección inicial del ADN plásmido en células 293-ORF6. Los vectores de Ad35 que codifican LacZ, GUS, o gp140B de VIH no se liberaron. Los genes LacZ, GUS, y gp140B se liberaron satisfactoriamente dentro de vectores de Ad35 eliminada la E1 y eliminadas las E1/E4.

- 40 Para determinar la estabilidad de los vectores de Ad35 que codifican LacZ, GUS, y gp140B, se llevó a cabo un ensayo de termoestabilidad. Con tal fin, se propagaron vectores de Ad35 eliminada la E1 en células 293-ORF6 y se purificaron mediante centrifugación por gradiente isopícnico (tres gradientes secuenciales de cloruro de cesio), se dializaron frente a cuatro intercambios de Tampón de Formulación Final (FFB), y se almacenaron a -80°C . Los vectores se descongelaron sobre hielo y se diluyeron hasta aproximadamente 1×10^{11} unidades de partícula (pu)/ml (una dilución mínima de 1:10) con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada en hielo, para diluir el agente estabilizante en el FFB. Las muestras de vector diluido se pusieron a 48°C , se retiraron del baño de agua, y se estabilizaron mediante dilución a igual volumen con PBS y suero bovino fetal al 10%. Las muestras se ensayaron para determinar la infectividad en un ensayo de formación de foco fluorescente mediante detección inmunofluorescente indirecta de la proteína hexón en células infectadas.

- 50 Los resultados de este análisis demostraron que los vectores de Ad35 eliminada la E1 fueron termolábiles (véase Figura 1). Para confirmar la observación de fenotipo termolábil, se analizó una preparación purificada de un vector termolábil mediante cromatografía de fase inversa y espectroscopía de masas (MS). Con tal fin, se fraccionaron aproximadamente 1×10^{11} partículas de adenovirus tipo 35 de tipo salvaje y de vector de Ad35 eliminada la E1 sobre una columna C4 (Phenomenex, Torrance, CA) y se recolectaron para posterior análisis mediante MS. Después de liofilizar las fracciones, las muestras se reconstituyeron en ácido trifluoroacético al 0,1%, acetonitrilo al 50%, y ácido sinapínico al 1% (Matriz MALDI). Un microlitro de la muestra reconstituida más la matriz se colocaron sobre una placa diana MALDI y se dejaron secar. El análisis mediante espectroscopía de masas (MS) se llevó a cabo usando un espectrómetro de MS Voyager DE-Pro MALDI (Applied Biosystems, Foster City, CA). La abundancia de proteína IX

se normalizó a la abundancia de hexón (las fracciones fueron concomitantes). Se observaron dos picos (véase Figura 2): un pico a 14,1 kDa/z que corresponde a la proteína IX individualmente cargada y un pico a 7 kDa/z que corresponde a la proteína IX doblemente cargada. La proteína IX fue significativamente menos abundante en el vector de Ad35 eliminada la E1 que la cantidad en el control de virus de tipo salvaje de Ad35 (véase Figura 2).

- 5 El promotor p5 (SEC ID NO: 11) del virus adeno-asociado (AAV), se introdujo dentro vectores 3' de Ad35 eliminada la E1 de la caja de expresión CMV (véase Figura 3), lo cual produjo un fenotipo termostable (véase Figura 1). Además, la introducción del promotor p5 dio como resultado la liberación con buen éxito del vector de Ad35 eliminada la E1 que expresó la gp140(B) del gen de VIH. Se obtuvieron altos rendimientos víricos de hasta 40.000 partículas/célula después de purificación mediante tres gradientes de cloruro de cesio.
- 10 Este ejemplo demuestra la termoestabilidad de un vector adenovírico eliminada la E1 basado en un adenovirus del subgrupo B que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX ligada de manera operable a un promotor heterólogo.

Ejemplo 6

- 15 Este ejemplo demuestra la capacidad de encapsidación potenciada de un vector adenovírico de Ad35 eliminada la E1 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX ligada de manera operable a un promotor heterólogo.

Diversos vectores de Ad35 con tamaños de genomas del 99,8% o inferior al tamaño del genoma del Ad35 de tipo salvaje cumplen el criterio para la liberación y propagación con éxito tal como se ha descrito en el Ejemplo 5. Estos vectores incluyen (a) vectores eliminada la E1, (b) vectores adenovíricos eliminada la E1 que contienen una caja de expresión posicionada en la región eliminada E1 tanto en la orientación 5'-3' como en la 3'-5' con respecto a la dirección de transcripción de E1, (c) vectores adenovíricos que comprenden el ligando RGD conjugado a la hélice HI o al C-terminal de la proteína de fibra, y (d) vectores adenovíricos que comprenden una proteína de fibra Ad35/Ad5 quimérica. Los vectores de Ad35 con tamaños de genoma más largos no se liberaron satisfactoriamente, tal como se demuestra mediante la reordenación genética de los genomas después de transfección y pasada. Los resultados de estos análisis se establecen en la Tabla 1 a continuación.

20

25

Tabla 1

Vector	Tamaño del genoma	% de tipo salvaje (34794 nucleótidos)	Estabilidad genética
Ad35.null	33.025	94,92%	Si
Ad35(3326)F(5K)	33.594	96,55%	Si
Ad35.f	33.736	96,96%	Si
Ad35.(3326f).F(HI-GRGD)	33.745	96,99%	Si
Ad35.(3326).F(C-RGD)	33.757	97,02%	Si
Ad35.f3326	33.828	97,22%	Si
Ad35(3326f)F(5S.5K)	34.392	98,84%	Si
Ad35(3326f).F(5S)	34.419	98,92%	Si
Ad35.S	34.561	99,33%	Si
Ad35(3418gp140B.ori2)F(5K)	34.581	99,39%	Si
Ad35(3326gp1408.ori2).F(5K)	34.668	99,64%	Si
Ad35.L	34.721	99,79%	Si
Ad35.G	34.774	99,94%	No
Ad35.gp140B	34.776	99,95%	No
Ad35.gp140B.F(HI-RGD)	34.799	100,01%	No
Ad35.gp140B.F(HI3G4CRGD)	34.856	100,18%	No
Ad35.gp140B.F(C5GS4CRGD)	34.868	100,21%	No

Tabla 1 (Cont.)

Vector	Tamaño del genoma	% de tipo salvaje (34794 nucleótidos)	Estabilidad genética
Ad35.gp140A	34.938	100,41%	No
Ad35.Z	36.075	103,68%	No

Independientemente del tamaño del genoma, los vectores de Ad35 eliminada la E1, fueron termolábiles (véase Figura 1). Para confirmar la observación de fenotipo termolábil, se analizó una preparación purificada de un vector de genoma pequeño eliminada la E1, Ad35.f, mediante SDS-PAGE. Específicamente, se cargaron $2,5 \times 10^{10}$ partículas de Ad35 de tipo salvaje y de Ad35.f sobre un gel de acrilamida con un 4-12% de gradiente bajo condiciones de desnaturalización (las muestras se trataron previamente con SDS y DTT a 100°C durante 10 minutos). Después de cromatografía a 180V durante aproximadamente una hora, el gel se tiñó con el kit de tinte de plata PlusOne™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Igualmente, el vector Ad35.f se analizó mediante cromatografía de fase inversa con espectroscopia de masas tal como se ha descrito en el Ejemplo 5. La proteína IX se detectó en este sector, pero fue significativamente menos abundante que la cantidad en el control de virus de tipo salvaje Ad35 (véanse Figuras 2 y 4).

Para mejorar la termoestabilidad, el promotor p5 del virus adeno-asociado (AAV) (SEC ID NO: 11) se introdujo dentro de un vector de Ad35 eliminada la E1 3' de la caja de expresión (véase Figura 3). El vector resultante, Ad35P5, comprendía un tamaño de genoma que fue 100,43% del genoma de Ad35 de tipo salvaje, y se comprobó para determinar su termoestabilidad tal como se ha descrito en el Ejemplo 5. El vector Ad35P5 mostró termoestabilidad (véase Figura 1), y fue liberado de manera eficaz. Se obtuvieron altos rendimientos víricos de hasta 40.000 partículas/célula después de purificación a través de tres gradientes de cloruro de cesio.

Este ejemplo demuestra la capacidad de encapsidación incrementada y termoestabilidad de un vector adenovírico de Ad35 eliminada la E1 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína pIX ligada de manera operable a un promotor heterólogo.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe el efecto de deleciones de la E1 próximas al gen de pIX sobre la estabilidad vírica en un vector adenovírico de Ad41.

Se construyeron vectores adenovíricos de Ad41 eliminada la E1 conteniendo una caja de expresión que comprende el gen de codificación de la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control de un potenciador/promotor CMV, mediante recombinación de homólogos en *E. coli* usando procedimientos conocidos en la técnica. Se generaron cuatro deleciones de la E1 diferentes, y la caja CMV-GFP se posicionó en la región E1 eliminada tanto en una orientación de izquierda a derecha como de derecha a izquierda. Los vectores adenovíricos se ensayaron para determinar su liberación, propagación, y estabilidad tal como se describe en la presente invención. Los resultados de este análisis se establecen en la Tabla 2.

La unión de la deleción sobre el lado izquierdo de la región E1 no tuvo efecto sobre la liberación, expansión, o estabilidad genética del genoma del vector Ad41. Por el contrario, la unión de la deleción sobre el lado derecho de la región E1 afectó a la liberación y estabilidad genética de los vectores. Fundamentalmente, los vectores de Ad41 eliminados en el nucleótido 3100 fueron liberados de manera eficaz tal como se evidencia por la aparición de efecto citopático durante la primera y segunda pasadas después de la transfección del plásmido genómico dentro de células 293-ORF6 (véase Tabla 2, líneas 1 y 5). De manera similar, los genomas de Ad41 con la unión de la deleción del nucleótido 3100 fueron genéticamente estables, tal como se confirmó mediante análisis por PCR de la región de la caja de expresión, a través de la segunda pasada después de la transfección (véase Tabla 2, líneas 1 y 5) y a través de una tercera pasada después de la transfección (datos no mostrados). Por el contrario, los vectores Ad41 con una unión de deleción del lado derecho en el nucleótido 3165 (es decir, 65 nucleótidos más próximos al codón iniciador de la proteína IX) no fueron viables o genéticamente estables. Los vectores Ad41 que comprenden la caja de expresión CMV en la orientación de derecha a izquierda (es decir, el potenciador CMV colindante con la región del gen de proteína IX) fueron liberados de manera eficaz, pero estos vectores fueron genéticamente inestables en la región de la E1 eliminada que contiene la caja de expresión (véase Tabla 2, líneas 2 y 3). Un vector Ad45 que contenía la misma deleción de la E1 pero conteniendo la caja de expresión CMV en la orientación de izquierda a derecha (es decir, el potenciador CMV colindante con el potenciador residual E1A) no pudo ser liberado (véase Tabla 2, línea 4). De acuerdo con ello, la unión de deleción del nucleótido 3100 no afectó significativamente la función del vector Ad41. La unión de deleción del nucleótido 3165 afectó a la viabilidad del genoma del vector, lo cual podría haber sido parcialmente compensado por la presencia del potenciador CMV bidireccional próximo al gen de la proteína IX.

Tabla 2

Coordinados							
	Izquierda	Derecha	Orientación de la caja CMV	cpe	PCR (P2)	N	
1	480	3100	Derecha a izquierda	+	+	5	
2	480	3165	Derecha a izquierda	+	Δ	2	
3	360	3165	Derecha a izquierda	+	Δ	2	
4	360	3165	Izquierda a derecha	-	n.a.	1	
5	360	3100	Derecha a izquierda	+	+	5	
N = número de vectores Ad41 ensayados; Δ = delección; n.a. = no aplicable							

Este ejemplo demuestra que un vector adenovírico del subgrupo F que contenía una delección próxima a la secuencia del ácido nucleico que codifica la pIX tiene viabilidad y estabilidad genética reducida.

- 5 Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patentes, y patentes, citadas en la presente invención, se incorporan por referencia en la misma medida que si cada referencia hubiera sido individualmente y específicamente indiada para ser incorporada por referencia y fueran establecidas en su totalidad en la presente invención.

El uso de los términos “un” y “uno” y “el” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones que siguen más adelante) han de considerarse que abarcan tanto el singular como el plural, salvo que se indique lo contrario en la presente invención o claramente estén en contradicción con el contexto. Los términos “comprende”, “tiene”, “incluye”, y “contiene” han de considerarse como términos en toda su extensión (es decir, significando “incluye, pero no limitado a”) salvo que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en la presente invención está destinada únicamente a servir como un procedimiento abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que entra dentro del intervalo, salvo que se indique lo contrario en la presente invención, y cada valor separado se incorpora dentro de la memoria descriptiva como si estuviera individualmente mencionado en la presente invención. Todos los procedimientos descritos en la presente invención pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado salvo que se indique lo contrario en la presente invención o de alguna otra forma entre en contradicción claramente con el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en la presente invención, está destinado únicamente a iluminar mejor la invención y no plantea una limitación sobre el ámbito de la invención, salvo que se reivindique de otra forma. Ninguna parte del lenguaje de la memoria descriptiva debería considerarse como indicativo de ningún elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

Las realizaciones preferidas de la esta invención están descritas en la presente invención, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Tras la lectura de la descripción anterior, pueden resultar obvias para los expertos normales en la técnica variaciones de las realizaciones preferidas. Los autores de la presente invención esperan que los técnicos expertos usen dichas variaciones según sea lo apropiado.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> GALL, Jason G. D.

WICKHAM, Thomas J.

ENRIGHT, William J.

5 BROUGH, Douglas E.

ZUBER, Mohammed

KING, C. Richter

<120> VACUNAS A BASE DE VECTOR ADENOVIRICO

10

<130> 229796

<150> US 60/490.106

<151> 25-07-2003

15

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.2

20

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Sintética

<400> 1

Cys Arg Gly Asp Cys
1 5

30

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Sintética

<220>

<221> DIVERSAS CARACTERÍSTICAS

<222> (2)..(2)

<223> "Xaa" puede ser cualquier aminoácido

5

<220>

<221> DIVERSAS CARACTERÍSTICAS

<222> (8)..(8)

<223> "Xaa" puede ser cualquier aminoácido

10

<400> 2

Cys Xaa Cys Arg Gly Asp Cys Xaa Cys

1

5

<210> 3

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> Sintética

<400> 3

Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys

1

5

<210> 4

25

<211> 144

<212> PRT

<213> Adenovirus

<400> 4

ES 2 391 975 T3

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

<210> 5

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Adenovirus

<400> 5

10

15

ES 2 391 975 T3

Met Ala Glu Glu Gly Arg Ile Tyr Val Pro Tyr Val Thr Ala Arg Leu
 1 5 10 15
 Pro Lys Trp Ser Gly Ser Val Gln Asp Lys Thr Gly Ser Asn Met Leu
 20 25 30
 Gly Gly Val Val Leu Pro Pro Asn Ser Gln Ala His Arg Thr Glu Thr
 35 40 45
 Val Gly Thr Glu Ala Thr Arg Asp Asn Leu His Ala Glu Gly Ala Arg
 50 55 60
 Arg Pro Glu Asp Gln Thr Pro Tyr Met Ile Leu Val Glu Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Gly Leu Lys Arg Arg Met Asp Leu Leu Glu Glu Ser Asn Gln Gln
 85 90 95
 Leu Leu Ala Thr Leu Asn Arg Leu Arg Thr Gly Leu Ala Ala Tyr Val
 100 105 110
 Gln Ala Asn Leu Val Gly Gly Gln Val Asn Pro Phe Val
 115 120 125

<210> 6

<211> 125

5 <212> PRT

<213> Adenovirus

<400> 6

ES 2 391 975 T3

Met Ala Glu Glu Gly Arg Ile Tyr Val Pro Tyr Val Thr Ala Arg Leu
 1 5 10 15
 Pro Lys Trp Ser Gly Ser Val Gln Asp Lys Thr Gly Ser Asn Met Leu
 20 25 30
 Gly Gly Val Val Leu Pro Pro Asn Ser Gln Ala His Arg Thr Glu Thr
 35 40 45
 Val Gly Thr Glu Ala Thr Arg Asp Asn Leu His Ala Glu Gly Ala Arg
 50 55 60
 Arg Pro Glu Asp Gln Thr Pro Tyr Met Ile Leu Val Glu Asp Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Gly Leu Lys Arg Arg Met Asp Leu Leu Glu Glu Ser Asn Gln Gln
 85 90 95
 Leu Leu Ala Thr Leu Asn Arg Leu Arg Thr Gly Leu Ala Ala Tyr Val
 100 105 110
 Gln Ala Asn Leu Val Gly Gly Gln Val Asn Pro Phe Val
 115 120 125

<210> 7

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Adenovirus

<400> 7

ES 2 391 975 T3

Met Ser Ala Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
 1 5 10 15
 Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
 20 25 30
 Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr
 35 40 45
 Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg
 85 90 95
 Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg
 100 105 110
 Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val
 115 120 125
 Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val
 130 135 140

<210> 8

<211> 140

<212> PRT

5 <213> Adenovirus

<400> 8

ES 2 391 975 T3

Met Ser Thr Asn Ser Phe Asp Gly Ser Ile Val Ser Ser Tyr Leu Thr
 1 5 10 15
 Thr Arg Met Pro Pro Trp Ala Gly Val Arg Gln Asn Val Met Gly Ser
 20 25 30
 Ser Ile Asp Gly Arg Pro Val Leu Pro Ala Asn Ser Thr Thr Leu Thr
 35 40 45
 Tyr Glu Thr Val Ser Gly Thr Pro Leu Glu Thr Ala Ala Ser Ala Ala
 50 55 60
 Ala Ser Ala Ala Ala Ala Thr Ala Arg Gly Ile Val Thr Asp Phe Ala
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ser Ser Ala Ala Ser Arg Ser Ser Ala Arg
 85 90 95
 Asp Asp Lys Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gln Leu Asp Ser Leu Thr Arg
 100 105 110
 Glu Leu Asn Val Val Ser Gln Gln Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gln Val
 115 120 125
 Ser Ala Leu Lys Ala Ser Ser Pro Pro Asn Ala Val
 130 135 140

<210> 9

5 <211> 132

<212> PRT

<213> Adenovirus

<400> 9

ES 2 391 975 T3

Met Ser Gly Phe Thr Glu Gly Asn Ala Val Ser Phe Glu Gly Gly Val
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Tyr Leu Thr Thr Arg Leu Pro Ser Trp Ala Gly Val Arg
 20 25 30
 Gln Asn Val Val Gly Ser Asn Val Asp Gly Arg Pro Val Ala Pro Ala
 35 40 45
 Asn Ser Thr Thr Leu Thr Tyr Ala Thr Ile Gly Ser Ser Val Asp Thr
 50 55 60
 Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Thr Ala Arg Gly Met
 65 70 75 80
 Ala Ala Asp Phe Gly Leu Tyr Asn Gln Leu Ala Ala Ser Arg Leu Arg
 85 90 95
 Glu Glu Asp Ala Leu Ser Val Val Leu Thr Arg Leu Glu Glu Leu Ser
 100 105 110
 Gln Gln Leu Gln Asp Met Ser Ala Lys Met Ala Leu Leu Asn Pro Pro
 115 120 125
 Ala Asn Thr Ser
 130

<210> 10

<211> 133

<212> PRT

5 <213> Adenovirus

<400> 10

Met Ser Gly Ser Met Glu Gly Asn Ala Val Ser Phe Lys Gly Gly Val
 1 5 10 15
 Phe Ser Pro Tyr Leu Thr Thr Arg Leu Pro Ala Trp Ala Gly Val Arg
 20 25 30
 Gln Asn Val Met Gly Ser Asn Val Asp Gly Arg Pro Val Ala Pro Ala
 35 40 45
 Asn Ser Ala Thr Leu Thr Tyr Ala Thr Val Gly Ser Ser Val Asp Thr
 50 55 60

ES 2 391 975 T3

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Thr Ala Arg Gly Met
65 70 75 80

Ala Ala Asp Phe Gly Leu Tyr Asn Gln Leu Ala Ala Ser Arg Ser Leu
85 90 95

Arg Glu Glu Asp Ala Leu Ser Val Val Leu Thr Arg Met Glu Glu Leu
100 105 110

Ser Gln Gln Leu Gln Asp Leu Phe Ala Lys Val Ala Leu Leu Asn Pro
115 120 125

Pro Ala Asn Ala Ser
130

<210> 11

<211> 166

<212> ADN

5 <213> Virus adeno-asociado

<400> 11

ctggaggggt ggagtcgtga cgtgaattac gtcatagggt tagggaggtc ctgtattaga 60
ggtcacgtga gtgttttgcg acattttgcg acaccatgtg gtcacgctgg gtatttaagc 120
ccgagtgagc acgcagggtc tccattttga agcgggaggt ttgaac 166

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de un vector adenovirico del no subgrupo C en la fabricacion de una composicion farmaceutica para la induccion de una respuesta inmune en un mamifero, en el que (a) el vector adenovirico del no subgrupo C comprende una proteina de fibra adenovirica que comprende una secuencia de aminoacido que comprende 80% o más de identidad con una secuencia de aminoacido de una proteina de fibra adenovirica del subgrupo C, (b) la proteina de fibra adenovirica se une a un virus Coxsackie y al receptor de adenovirus (CAR), y (c) el vector adenovirico comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno el cual es expresado en el mamifero para inducir una respuesta inmune.
- 10 **2.** El uso de la reivindicación 1, en el que el vector adenovirico es un vector adenovirico del subgrupo B o un vector adenovirico del subgrupo F.
- 3.** El uso de la reivindicación 2, en el que el vector adenovirico es un vector adenovirico del serotipo 35.
- 4.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la proteina de fibra adenovirica del subgrupo C es una proteina de fibra adenovirica del serotipo 5.
- 15 **5.** El uso de la reivindicación 4, en el que la proteina de fibra adenovirica comprende un dominio tallo de una proteina de fibra adenovirica del serotipo 5 y un dominio botón de una proteina de fibra del serotipo 5.
- 6.** El uso de la reivindicación 5, en el que la proteina de fibra adenovirica comprende un dominio tallo de una proteina de fibra adenovirica del serotipo 5, un dominio cola de una proteina de fibra del serotipo 35, y un dominio botón de una proteina de fibra del serotipo 5.
- 20 **7.** El uso de la reivindicación 2, en el que el vector adenovirico es un vector adenovirico del serotipo 41.
- 8.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el vector adenovirico comprende un genoma adenovirico que es deficiente en una o más funciones del gen esenciales para la replicación de la región E1 y/o la región E4 del genoma adenovirico.
- 25 **9.** El uso de la reivindicación 8, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno está posicionada en la región E1 o la región E4 del genoma adenovirico.
- 10.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el vector de transferencia del gen de cebado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno, es para ser administrada al mamifero antes de administrar al mamifero el vector adenovirico.
- 30 **11.** El uso de la reivindicación 10, en el que el vector de transferencia del gen de cebado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer antígeno, el vector adenovirico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo antígeno, y el primer antígeno y el segundo antígeno son el mismo antígeno.
- 12.** El uso de la reivindicación 10, en el que el vector de transferencia del gen de cebado comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer antígeno, el vector adenovirico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo antígeno, y el primer antígeno y el segundo antígeno son diferentes.
- 35 **13.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el vector de transferencia del gen de cebado es un vector adenovirico.
- 14.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que múltiples vectores adenoviricos, comprendiendo cada vector adenovirico una o más secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más antígenos, son para ser administrados al mamifero.
- 40 **15.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el vector adenovirico comprende una proteina de recubrimiento quimerica que comprende una secuencia de aminoacido no nativa que codifica un antígeno.
- 16.** El uso de la reivindicación 15, en el que al menos un antígeno está presente mediante complejos de histocompatibilidad principal tipo I (MHC I) y al menos un antígeno está presente mediante complejos MHC II.
- 17.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el vector adenovirico comprende unas secuencias de ácido nucleico nativas que carecen de genoma adenovirico que codifican proteinas adenoviricas.
- 45 **18.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en el que una secuencia espaciadora está posicionada en la región E4 del genoma adenovirico.
- 19.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el vector adenovirico comprende múltiples secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes antígenos.
- 50 **20.** El uso de la reivindicación 19, en el que dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican antígenos diferentes están ligadas de manera operable a diferentes promotores.

- 21.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el vector adenovirico comprende múltiples secuencias de ácido nucleico que codifican el mismo antígeno.
- 22.** El uso de la reivindicación 21, en el que dos o más secuencias de ácido nucleico que codifican el mismo antígeno están ligadas de manera operable a diferentes promotores.
- 5 **23.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en el que el vector adenovirico comprende una proteína de recubrimiento quimerica que comprende una secuencia de aminoácido no nativa, y en la que la secuencia de aminoácido no nativa comprende un motivo RGD.

Figura 1

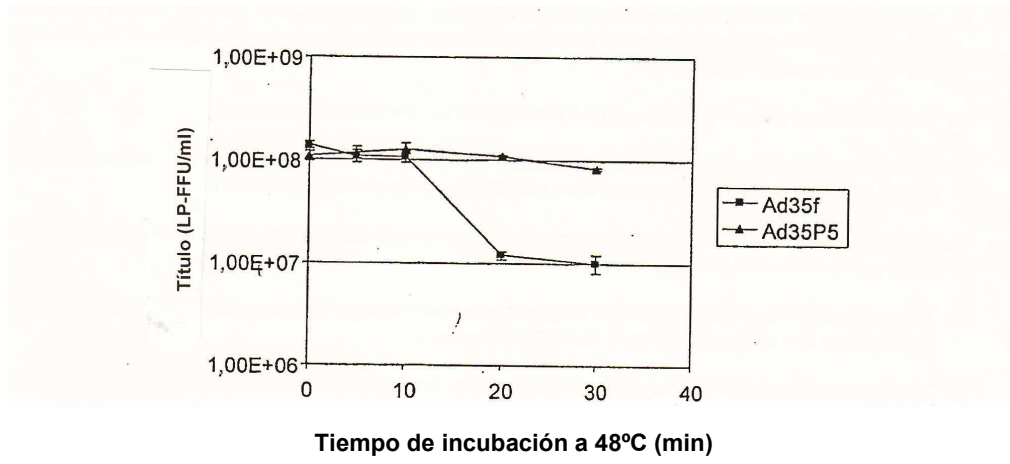


Figura 2

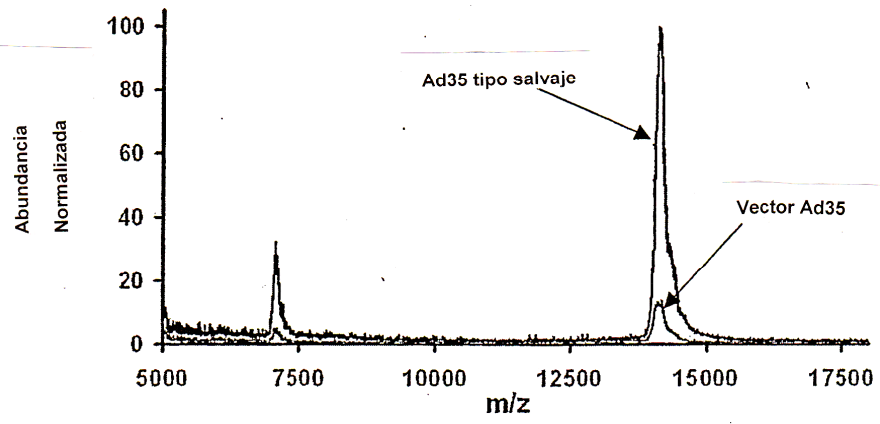
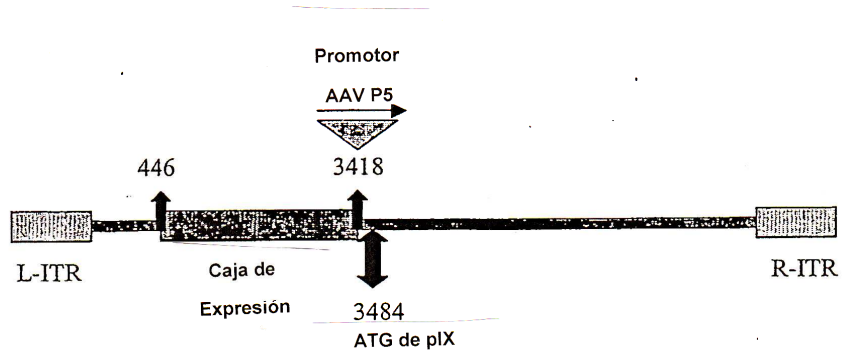


Figura 3



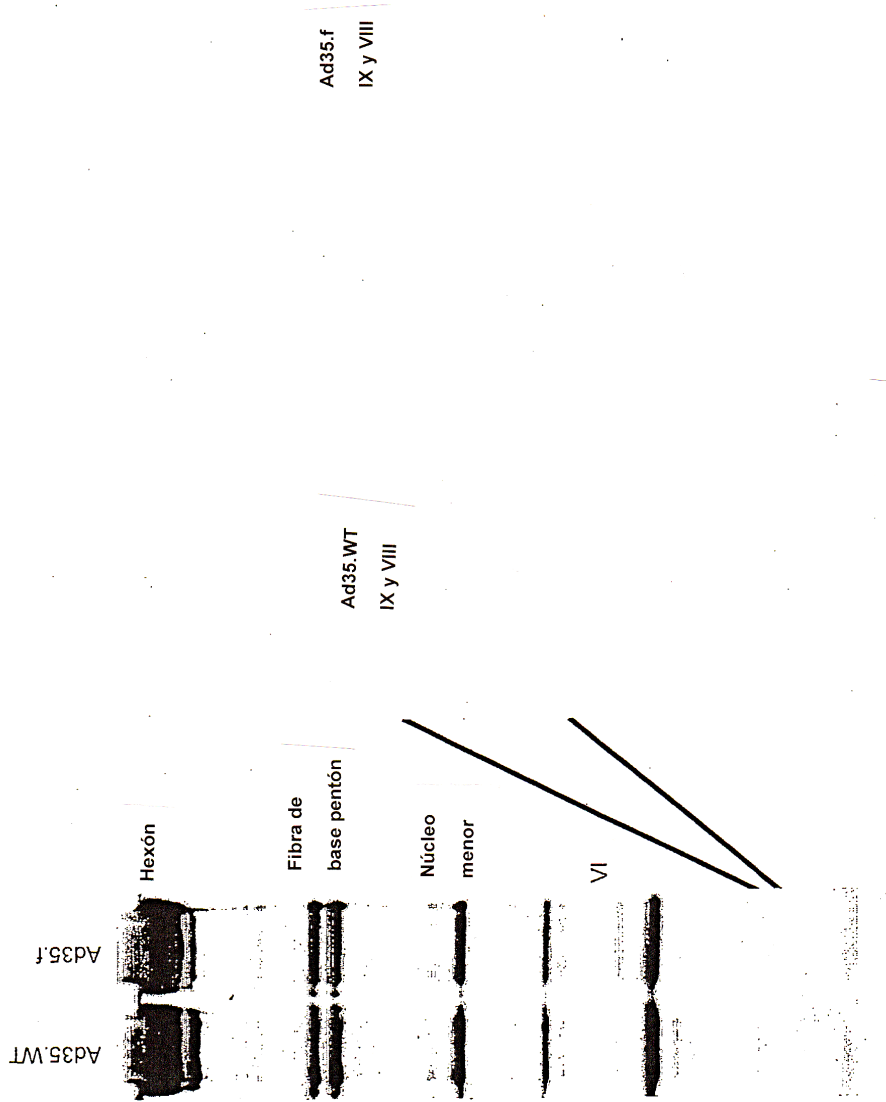


Figura 4