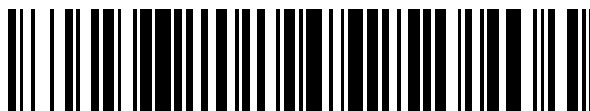


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 834**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010** **E 13191475 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015** **EP 2695945**

54 Título: **Métodos y reactivos para una transferencia génica eficaz y dirigida a células del linaje de monocitos macrófagos**

30 Prioridad:

29.04.2009 EP 09159001

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.11.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
(25.0%)**

**Advar - Edifici A - Campus Universitari s/n
08193 Bellaterra, Barcelona, ES;**

GRIFOLS, S.A. (25.0%);

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN
CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I
PUJOL (25.0%) y**

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE
RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS (25.0%)**

72 Inventor/es:

GASSULL DURO, MIQUEL ÀNGEL;

RÍO FERNÁNDEZ, ADOLFO;

FERNÁNDEZ GIMENO, ESTER y

CHILLÓN RODRÍGUEZ, MIGUEL

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 550 834 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y reactivos para una transferencia génica eficaz y dirigida a células del linaje de monocitos-macrófagos

5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a la capacidad del adenovirus 5 humano quimérico que porta la fibra corta de Ad40 entérico para transferir material genético a monocitos y macrófagos en un procedimiento eficaz y selectivo, y a la optimización de la respuesta a la dosis y el perfil de bioseguridad en células transducidas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células mononucleares se han definido como un linaje de células hematopoyéticas derivadas de células progenitoras en la médula ósea. Las células progenitoras mieloides comprometidas se diferencian formando monocitos sanguíneos, que circulan en la sangre y, a continuación, entran en los tejidos convirtiéndose en macrófagos residentes. Durante muchos años se ha conocido y estudiado la existencia de subconjuntos de monocitos en seres humanos. Se identificaron monocitos humanos mediante la expresión de CD14. Pueden clasificarse además basándose en la expresión de CD16 (el receptor de Fc de alta afinidad). Las células CD16- se denominan monocitos *clásicos* dado que son habitualmente aproximadamente el 90% de los monocitos totales en individuos sanos. Las células CD16+ parecen expandirse en muchas enfermedades inflamatorias y presentan una migración preferente a través de las capas endoteliales en respuesta a quimiocinas. Por tanto, se denominan habitualmente monocitos *no clásicos* o *proinflamatorios*. Se ha demostrado que este subconjunto de monocitos puede diferenciarse en células dendríticas (CD). Se ha descrito un aumento considerable en el número de monocitos CD14+CD16+ para una variedad de infecciones sistémicas y localizadas.

25

Mientras que los monocitos son células ampliamente reclutables, la mayor parte de la capacidad migratoria de macrófagos derivados de monocitos y CD se suprime en el proceso de maduración debido a una pérdida progresiva de receptores de quimiocinas inflamatorias. A la inversa, la regulación por incremento de CCR7 durante el proceso de maduración de CD aumenta su respuesta migratoria hacia los vasos linfáticos y ganglios linfáticos de drenaje. (Eur. J. Immunol 1998. 28:2760-2769; J. Neuroimmunol 2008 197:21-28).

30

Por tanto, la manipulación genética de los monocitos sanguíneos es sumamente atractiva dado que puede permitir la manipulación de la respuesta inmunitaria en una ubicación particular en la que tiene lugar un proceso inflamatorio y a la que migrarán preferentemente los monocitos bajo la influencia de factores quimiotácticos liberados por células dañadas en sitios inflamados.

35

Los monocitos se encuentran en la sangre humana en cantidades variables, oscilando desde el 5-10% de los leucocitos de sangre periférica totales en individuos sanos, aunque este número puede superarse enormemente siempre que esté presente un estado inflamatorio. Varían en tamaño y tienen diferentes grados de granularidad y una morfología nuclear variada. De hecho, los monocitos se reclutan preferentemente en zonas inflamadas, en las que adquieren nuevos papeles y realizan funciones fagocíticas y de presentación de antígenos. En ciertas condiciones, pueden evolucionar a células dendríticas, que son células presentadoras de antígenos sumamente eficaces y que organizan la respuesta inmunitaria provocada frente a un ataque particular y dirigen la función de los linfocitos.

45

Los macrófagos son relativamente resistentes a la transfección, aunque hay varios informes que reivindican que pueden utilizarse finalmente vectores adenovirales como vectores para transfectar macrófagos derivados de monocitos, células dendríticas o incluso monocitos (Eur. J. Immunol. 1999, 29: 964-972; Blood 1998 91: 392-398; Acta Pharmacol. Sin. 2006, 27: 609-616; Biochem. Biophys. Res. Com. 1993, 195: 1174-1183; Gene Ther. 2000, 7: 263-270, Cytotherapy, 2006 8: 36-46; Mol. Ther. 2007, 16: 210-217 y J. Immunol. 2008, 181: 8018-8026). Sin embargo, estos informes no utilizan monocitos no diferenciados y no estimulados dado que cultivan células en presencia de diferentes combinaciones de citocinas y factores, tales como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), también conocido como factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y otros. En contacto con los monocitos, M-CSF potencia la expresión de antígenos de diferenciación, aumenta las actividades quimiotácticas y fagocíticas y estimula la producción de varias citocinas (Ross J. A. y Auger M. J. en The Macrophage, segunda edición; Oxford University Press, 2002; Pathol. Int. 2008, 58: 143-155). Además, se ha demostrado que pueden generarse CD humanas a partir de monocitos en presencia de GM-CSF solo (Immunobiology 2008, 213: 859-870). En cambio, los monocitos se consideran esencialmente como células no transfectables (Gene Ther. 1997, 4: 524-532; J. Immunol. Methods 2008, 330: 86-95). De ese modo, los intentos hasta la fecha de transfectar selectivamente monocitos no diferenciados y no estimulados de sangre periférica utilizando o bien electroporación o bien métodos virales y no virales no han tenido éxito (Gastroenterology 2006 131:1799-181). Notablemente, la utilización reciente de vectores de Ad5 quimérico que portan fibras de Ad35 y Ad11 ha permitido la infección de diferentes células sanguíneas primarias incluyendo células T, células B y monocitos (Virology 2006, 25: 349(1): 96-111). Además, Herold y otros, (Langenback's Archives of Surgery, 2006, 391:72-82) han notificado también la utilización de adenovirus para

65

transfectar monocitos, Gerstzen y otros., (J. Biol. Chem. 2001, 276: 26846-26851) y Kaan-Shanzer y otros, 2001, Hum. Gene Therapy, 12:1989-2005) han notificado que los adenovirus pueden utilizarse para transducir monocitos de sangre del cordón umbilical. Mayne y otros (J. Immunol. Methods, 2003, 278: 45-56) han descrito que la eficacia de la transfección de células CD14+ con adenovirus puede mejorarse si la células se centrifugan en presencia de adenovirus antes de la etapa de transducción.

La solicitud de patente internacional WO9850053 describe métodos para transducir monocitos utilizando vectores adenovirales quiméricos que utilizan adenovirus Ad5 recombinante que comprende la proteína de fibra de Ad3. Este método permite una eficacia de transducción del 80% (a 100 partículas infectivas/célula) o del 100% (a 1000 100 partículas infectivas/célula).

Sin embargo, ninguno de estos vectores es particularmente eficaz para su utilización *in vivo* dado que pueden transducir otros tipos de células dando como resultado por tanto efectos secundarios debidos a la infección de células no diana. Por tanto, se necesitan en la técnica métodos y reactivos que permitan la transducción selectiva y eficaz de monocitos de sangre periférica no comprometidos, no estimulados y no diferenciados.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos *in vitro* y a nanotransportadores para su utilización en medicina, tal como se define en las reivindicaciones.

Además, en la presente memoria descriptiva se da a conocer a un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo con la condición de que el nanotransportador no sea una partícula viral.

Además se da a conocer un método *in vitro* para suministrar un compuesto de interés a una célula del linaje de monocitos-macrófagos que comprende poner en contacto dicha célula con un nanotransportador que porta dicho compuesto de interés y en el que el transportador contiene, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Adicionalmente se da a conocer un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su utilización en medicina.

Adicionalmente se da a conocer un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su utilización en el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra el porcentaje de infección de vectores de adenovirus 5 humano y adenovirus 5/40 quimérico en la línea celular de monocitos murinos RAW 264.7.

La figura 2 muestra el porcentaje de infección de vectores de adenovirus 5 humano y adenovirus 5/40 quimérico en las líneas celulares de monocitos humanos THP-1 (alta capacidad de infección) y U-937 (baja capacidad de infección).

La figura 3 muestra las proporciones de las diferentes poblaciones de células sanguíneas en controles humanos. Los linfocitos T son la población principal (representando el 87% del total). Los monocitos representan sólo el 8% de las células mononucleares totales en la sangre.

La figura 4 muestra el porcentaje de infección de vectores de adenovirus 5 humano y adenovirus 5/40 quimérico en las diferentes poblaciones de células sanguíneas. Las poblaciones de células se identificaron mediante marcadores específicos de membrana utilizando análisis de fluorescencia (FACS): CD3+ (linfocitos T), CD19 + (linfocitos B), CD56+ / CD16+ / CD3- (células NK), CD14+ (monocitos).

La figura 5 muestra cómo los monocitos proinflamatorios (CD14+/CD16+) y los monocitos clásicos (CD14+ / CD16-) se infectan igualmente mediante vectores adenovirales.

La figura 6 muestra cómo el adenovirus 5/40 quimérico permite una expresión transgénica superior de GFP que la del adenovirus 5, en monocitos (CD14+/CD16-) o bien (CD14+/CD16+).

La figura 7 muestra cómo el adenovirus 5/40 quimérico permite una expresión transgénica de GFP mayor con respecto al adenovirus 5, en monocitos (CD14+/CD16-) o bien (CD14+/CD16+). Ad5: línea continua. Ad5/40: línea discontinua.

La figura 8 muestra el porcentaje de infección de monocitos (CD14+) a diferentes dosis de partículas virales por célula. Ad5/40: línea continua. Ad5: línea discontinua.

5 La figura 9 muestra la viabilidad de monocitos (CD14+) dependiendo de la dosis de adenovirus Ad5 y Ad5/40 utilizada. Ad5/40: línea continua. Ad5: línea discontinua.

La figura 10 muestra la viabilidad de monocitos (CD14+) que expresan el transgén GFP dependiendo de la dosis de adenovirus Ad5 y Ad5/40 utilizada. Ad5/40: línea continua. Ad5: línea discontinua.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, los monocitos no diferenciados y no estimulados, una línea celular que se pensaba hasta la fecha que era resistente a la transfección, podían de hecho transfectarse utilizando vectores de adenovirus 5 humano quimérico que portaban la fibra corta de Ad40 entérico. De hecho, tal como se muestra en los ejemplos 1 a 3 de la presente invención, un adenovirus Ad5 recombinante que comprende la proteína de fibra corta de Ad40 puede transfectar monocitos de ratón de la mucosa intestinal, macrófagos humanos derivados de monocitos y monocitos de sangre periférica no diferenciados y no estimulados. La capacidad del adenovirus quimérico Ad5/40 para transferir materiales genéticos a monocitos parece depender de la presencia dentro del virus de la fibra corta de Ad40, tal como se muestra mediante el hecho de que los Ad5 que portan su propia proteína de fibra son mucho menos eficaces en la transfección de monocitos (véase el ejemplo 5 de la presente invención). Este hallazgo abre la puerta al desarrollo de proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F.

15

20

A. NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCIÓN

25

Por tanto, en la presente memoria descriptiva se da a conocer un nanotransportador que comprende, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

30

El término "nanotransportador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un complejo de múltiples componentes con dimensiones controladas, por ejemplo, un diámetro o radio del orden de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nanómetros que contiene un compuesto de interés. Los nanotransportadores preferentes para su utilización en la presente invención incluyen virus, partículas similares a virus (VLP), nanopartículas, armazones proteicos y similares. En el caso de que el nanotransportador sea un virus, entonces el virus es preferentemente un virus diferente de un adenovirus del subgrupo F.

35

a. Nanotransportadores virales

En una realización, el nanotransportador de la presente invención es un virus. El experto apreciará que puede utilizarse como nanotransportador en la presente invención cualquier virus conocido en la técnica siempre que esté disponible suficiente información de modo que se permita la modificación de los componentes externos mediante la proteína de fibra corta de un adenovirus de subgrupo. Por tanto, en el caso de virus no envueltos, los nanotransportadores de la presente invención se obtienen modificando directamente, como mínimo, una de las proteínas de la cápsida, o bien mediante acoplamiento químico de la proteína de fibra corta o bien insertando la secuencia que codifica la proteína de fibra corta en el gen viral que codifica la proteína de la cápsida de modo que, tras la síntesis y el ensamblaje para dar la cápsida, la proteína de fibra corta se expone en la superficie externa de la cápsida. Los ejemplos de cápsidas de virus adecuadas que pueden modificarse de la anterior manera incluyen, pero sin limitación a las mismas, cápsidas de sindbis y otros alfavirus, rabdovirus (por ejemplo virus de la estomatitis vesicular), picornavirus (por ejemplo, rinovirus humano, virus Aichi), togavirus (por ejemplo, virus de la rubéola), ortomixovirus (por ejemplo, virus Thogoto, virus Batken, virus de la gripe aviar), poliomavirus (por ejemplo, poliomavirus BK, poliomavirus JC, poliomavirus aviar BFDV), parvovirus, rotavirus, bacteriófago Q β , bacteriófago PI, bacteriófago M13, bacteriófago MS2, bacteriófago G4, bacteriófago P2, bacteriófago P4, bacteriófago 186, bacteriófago Φ 6, bacteriófago Φ 29, bacteriófago MS2, bacteriófago N4, bacteriófago Φ X174, bacteriófago AP205, virus Norwalk, virus de la fiebre aftosa, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus del mosaico del tabaco (VMT), virus del mosaico del *Panicum satellite* (VMPS), virus del escarabajo neozelandés (virus flock house) y papilomavirus humano.

55

Alternativamente, cuando el nanotransportador es un virus envuelto, la proteína de fibra corta está unida preferentemente a una parte de las glicoproteínas de la envuelta o sustituyendo la misma. Algunos ejemplos no limitativos de las glicoproteínas de superficie que pueden utilizarse para insertar la proteína de fibra corta incluyen glicoproteínas de alfavirus, tales como el virus del bosque de Semliki (VBS), virus del río Ross (VRR) y virus Aura (VA), que comprenden glicoproteínas de superficie, tales como E1, E2 y E3. Las glicoproteínas E2 derivadas del virus Sindbis (SIN) y la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe son glicoproteínas no retrovirales que se unen específicamente a moléculas particulares sobre superficies celulares (glicosaminoglucano heparán sulfato para E2, ácido siálico para HA) que se sabe que toleran ciertas modificaciones genéticas y permanecen ensambladas de manera eficaz sobre la superficie retroviral (Morizono y otros J. Virol. 75, 8016-8020); se utilizan glicoproteínas del virus de la fiebre de Lassa, virus de la hepatitis B, virus de la rabia, virus de la enfermedad de Borna, virus Hantaan o SARS-CoV; glicoproteínas de superficie basadas en flavivirus, hemaglutinina (HA) de la gripe A/virus de la gripe

60

65

aviar/Rostock/34 (FPV), un futilizógeno de clase I (T. Hatzioannou, S. Valsesia-Wittmann, S. J. Russell, F. L. Cosset, J. Virol. 72, 5313 (1998)). Virus adecuados para su utilización en la presente invención comprenden alfavirus, paramixovirus, rabdovirus, coronavirus, picornavirus, mixovirus, reovirus, bunyavirus, flavivirus, rubivirus, filovirus, arenavirus, arterivirus o calicivirus.

5 Los virus adecuados que pueden modificarse mediante la inserción de la proteína de fibra corta de adenovirus del subgrupo F incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus ARN de cadena negativa, tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo virus del sarampión y Sendai), virus ARN de cadena positiva, tales como picornavirus y alfavirus, y virus ADN bicatenario incluyendo adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Otros virus incluyen, por ejemplo, virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y virus de la hepatitis. Los ejemplos de retrovirus incluyen virus de sarcoma-leucosis aviar (por ejemplo, virus de la leucosis aviar, virus del sarcoma aviar), retrovirus tipo C, tipo B, tipo D de mamífero, virus HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., "Retroviridae: The viruses and their replication", en *Fundamental Virology*, tercera edición, editado por B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, y otros, Lippincott-Raven Filadelfia, Pa. (1996)). Otros ejemplos incluyen virus de la leucemia murina, virus del sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia aviar, virus de la leucemia de células T humana, virus endógeno de babuinos, virus de la leucemia del gibón, virus Mason-Pfizer del mono, virus de la inmunodeficiencia del simio, virus del sarcoma del simio, virus del sarcoma de Rous y lentivirus.

25 Los retrovirus contienen dos subunidades de glicoproteína de la envuelta (designadas de superficie o SU y transmembrana o TM) que forman un complejo oligomérico en la superficie viral y median la entrada viral. La proteína SU contiene el receptor viral que se une a determinantes mientras que la proteína TM contiene una región transmembrana hidrófoba y un segmento hidrófobo separado que media la fusión virus-membrana celular (Weiss, R. A., "Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry," págs. 1-107, en J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 2., Plenum Press: Nueva York, N.Y. (1993)). La primera etapa de la infección es la unión de la partícula viral a través de la proteína de superficie de la envuelta del retrovirus, proteína (env), y la fusión de la membrana viral y celular para lograr la captación viral a través de la proteína transmembrana de la proteína env. La proteína env es en gran medida responsable de la especificidad (entre tipos de células y entre especies) de la capacidad de infección de los vectores retrovirales. Si se utilizan retrovirus como nanotransportadores según la presente invención, la proteína de fibra corta adenoviral del subgrupo F puede insertarse en cualquier subunidad de la glicoproteína de la envuelta o en la glicoproteína env.

35 Los virus adenoasociados (VAA) tienen un genoma de ADN monocatenario lineal y su receptor no se ha descrito todavía. Estos virus experimentan sólo una infección productiva si las células infectadas se infectan conjuntamente con un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus), de lo contrario el genoma se integra en un estado latente en un sitio específico en un cromosoma humano (Linden, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11288-11294 (1996); y Bems, K. J., "Parvoviridae: The viruses and their replication" en *Fields Virology*, tercera edición, editado por B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley y otros, Lippincott-Raven Publishers: Filadelfia, Pa. (1996)). Se preparan normalmente virus adenoasociados recombinantes sustituyendo genes virales por genes de interés deseados o simplemente añadiendo las secuencias de ADN de VAA terminales (ITR) a estos genes.

45 Alternativamente, los nanotransportadores de la presente invención pueden basarse en virus ARN de cadena negativa. Estos virus pueden infectar células mediante una variedad de diferentes mecanismos. Por ejemplo, los virus de la gripe A tienen un genoma de ARN segmentado, contienen una proteína hemaglutinina de superficie que se une a receptores de ácido siálico de la superficie celular y media la entrada viral en un endosoma de pH bajo tras la endocitosis mediada por receptor. La presente invención contempla la modificación de la HA de superficie mediante la inserción de la proteína de fibra corta adenoviral. Los paramixovirus que tienen un genoma de ARN no segmentado tienen dos proteínas virales de superficie, la hemaglutinina (HN) y una proteína de fusión (F), requeridas para la entrada viral que se produce a pH neutro. Estos virus pueden utilizar receptores de ácido siálico, o receptores de proteína (por ejemplo, CD46 utilizado por el virus del sarampión), para la entrada viral. La proteína de fibra corta adenoviral puede insertarse o unirse o bien a la hemaglutinina (HN) o bien a la proteína de fusión (F).

55 Los rabdovirus (por ejemplo, VSV) que tienen un genoma de ARN no segmentado, contienen una proteína de superficie (G) que se une a receptores específicos de la superficie celular y media la entrada viral en un endosoma de pH bajo. Un fosfolípido específico parece ser uno de los receptores para VSV. La proteína de fibra corta adenoviral puede insertarse o unirse a la proteína G.

60 En otra realización, los nanotransportadores de la presente invención pueden basarse en virus ARN de cadena positiva. Estos virus infectan células mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, entre los picornavirus, se utilizan diferentes miembros de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas como receptores celulares por poliovirus, por los subgrupos principales de los rinovirus y por virus coxsackie B, mientras que se utiliza una proteína integrina por algunos tipos de ecovirus y se utiliza un receptor de lipoproteína de baja densidad por subgrupos minoritarios de rinovirus. Tras la unión al receptor, no se sabe todavía de manera precisa qué papel desempeña la endocitosis

mediada por receptor para la entrada del picornavirus, si se requiere de hecho. Debido a que los picornavirus carecen de una bicapa lipídica de superficie, su ruta de entrada no implica la fusión de una membrana viral con una membrana celular huésped. Por tanto, si los picornavirus van a utilizarse como nanotransportadores, la proteína de fibra corta adenoviral debe unirse o acoplarse a una proteína de la cápsida tal como las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4.

En cambio, los alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis y virus Semliki) sí contienen una bicapa lipídica de superficie. Estos virus contienen dos proteínas de superficie (E1 y E2), y en algunos casos una tercera proteína de superficie (E3) importante para la entrada viral. Estos virus utilizan diversos receptores de la superficie celular. Por ejemplo, el virus Sindbis puede utilizar un receptor de laminina u otros receptores y generalmente entra en las células mediante un mecanismo dependiente del pH, tras la endocitosis mediada por receptor. Por tanto, los nanotransportadores según la presente invención basados en alfavirus pueden contener la proteína de fibra corta adenoviral unida o insertada dentro de las proteínas de superficie E1 y/o E2.

Otra posibilidad es la utilización de herpesvirus como nanotransportadores según la presente invención. Los herpesvirus tienen genomas de ADN bicatenario grandes que contienen varias glicoproteínas de superficie implicadas en la entrada viral y utilizan diversos receptores de la superficie celular. Por ejemplo, la entrada del virus del herpes simple y el citomegalovirus implica la unión a un receptor de la superficie celular de heparán sulfato y los virus del herpes simple utilizan otras proteínas (por ejemplo, HVEM) para la entrada viral. En cambio, la entrada del virus de Epstein-Barr se inicia mediante la unión a un receptor de la superficie celular completamente distinto, CR2 (Wolf, *Intervirology* 35:26-39 (1993)). Se han descrito estrategias que permiten diseñar virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr como vectores para la expresión génica heteróloga.

En otra realización, la presente invención contempla la utilización de poxvirus como nanotransportadores. Los poxvirus tienen genomas de ADN bicatenario grandes y entran en las células mediante un mecanismo independiente del pH a través de receptores que permanecen por definir. Los vectores de poxvirus se han utilizado extensamente para la expresión de genes recombinantes heterólogos y como vacunas (Moss, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11341-11348 (1996); y Paoletti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11349-11353 (1996)).

En otra realización, los nanotransportadores son retrovirus pseudotipados en los que la proteína env del retrovirus se sustituye por la proteína de fibra corta adenoviral. Normalmente, se producen vectores retrovirales mediante "líneas celulares empaquetadas" que proporcionan las proteínas retrovirales necesarias para la infección (por ejemplo, env, gag y pol), pero que no pueden replicarse tras la infección. Véase, por ejemplo, Miller, AD, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 158, págs. 1-24 (1992). Los vectores retrovirales adecuados para su utilización con la presente invención incluyen, sin limitación, vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MLV), e incluyen vectores derivados de retrovirus más complejos, por ejemplo, vectores derivados de lentivirus. Los vectores derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) pertenecen a esta categoría. Otros ejemplos incluyen vectores de lentivirus derivados de VIH-2, virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) y virus maedi/visna.

En una realización más preferente, los nanotransportadores de la presente invención son adenovirus. En este caso, los adenovirus no son adenovirus del subgrupo F del mismo tipo que la proteína de fibra corta, es decir, si la proteína de fibra corta se deriva de un adenovirus Ad40, el nanotransportador puede ser otro adenovirus con la excepción de Ad40. A la inversa, si la proteína de fibra corta se deriva de un adenovirus Ad41, el nanotransportador puede ser cualquier adenovirus con la excepción de Ad41. Los adenovirus tienen un genoma de ADN bicatenario lineal. La infección por adenovirus de células diana se produce mediante tres interacciones ligando-receptor físicamente distintas. En primer lugar, el dominio knob de la proteína de fibra de la superficie viral se une específicamente a un receptor de la superficie celular. En el caso de células HeLa humanas, el receptor para los adenovirus 2 y 5 se designa como CAR, un miembro de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas, que también sirve como receptor celular para los virus de coxsackie B (Bergelson, 1996, *Science*, 275:1320-1323). En segundo lugar, la interacción tiene lugar entre la proteína de la base del pentón viral e integrinas alfaV. Un tercer sitio de unión al receptor está ubicado en la tercera repetición de espiral beta en el tallo de la fibra y media la unión a glucosaminoglucanos heparán sulfato (HSG). Otros polipéptidos presentes en la superficie de partículas adenovirales incluyen las proteínas del capsómero que incluyen los hexones componentes principales así como cantidades minoritarias de pIIIa y pIX.

La alteración del direccionamiento adenoviral se ha llevado a cabo mediante la modificación de las proteínas del capsómero (Campos y Barry, 2006, *Virology*, 349:453-462) si bien es cierto que con eficacia inferior que mediante la modificación de la proteína de fibra. Por tanto, aunque la presente invención prevé la unión o fusión de la proteína de fibra corta con cualquier proteína de la superficie adenoviral, es preferente que la unión o fusión se realice sobre, como mínimo, uno de los polipéptidos de superficie responsables de la unión a la célula diana. Por tanto, preferentemente, el adenovirus puede modificarse insertando o bien uniendo la proteína de fibra corta adenoviral del subgrupo F a la base del pentón o bien, más preferentemente, a la propia proteína de fibra adenoviral.

Las fibras de adenovirus son proteínas triméricas que consisten en un dominio C-terminal globular (el dominio "knob"), un tallo fibroso central y una parte N-terminal (el dominio cola ("tail")) que se une a la cápsida viral. En presencia del dominio

C-terminal globular, que es necesario para una correcta trimerización, el segmento de tallo adopta una conformación espiral beta triple. Las proteínas de fibra se incorporan como trímeros en la estructura de la cápsida. El experto apreciará que la incorporación de la proteína de fibra corta en la proteína adenoviral puede llevarse a cabo de diferentes maneras, dependiendo de si el tropismo nativo del adenovirus va a conservarse o suprimirse.

5 En una realización preferente, es posible añadir las proteínas de fibra corta al extremo C-terminal de la fibra tal como se describió (Michael y otros, 1995, Gene Therapy, 2:660-668 y Wickham, T.J., y otros, 1997, J. Virol., 71: 8221-8229). Alternativamente, es posible incorporar insertos en el bucle HI de la fibra knob tal como se describió anteriormente (Nicklin y otros, 1998, J. Virol., 72: 1844-1852 y Krasnykh, V., y otros, 1998, J. Virol., 72: 1844-1852),
 10 un enfoque que se ha demostrado que tolera la introducción de ciertos péptidos mayores de 100 residuos sin afectar sustancialmente a la propagación e capacidad de infección de los AdV resultantes. Además, es posible insertar la proteína de fibra corta dentro de una molécula espícula recombinante en la que el dominio de fibra knob solo o en combinación con (parte de) el dominio de tallo de la fibra se ha sustituido por un dominio de trimerización exógeno tal como se describe por van Beusechem, V. W., y otros, (Gene Ther., 2000, 7: 1940-1946 y Magnusson y otros (J. Virol., 2001, 75: 7280-7289). Este enfoque tiene la ventaja de que permite ampliar la gama de posibles epítopos de direccionamiento así como elimina sitios de unión nativos que residen en la fibra knob. Las moléculas de espícula recombinante se denominan en el presente documento "fibras sin knob" o "proteínas de espícula de adenovirus quimérico". Una molécula de fibra sin knob o una proteína de espícula de adenovirus quimérico se define porque carece esencialmente de un dominio knob de fibra funcional, puede formar trímeros y puede unirse sobre una
 20 cápsida de adenovirus. Una "fibra sin knob" no significa por tanto que la molécula sea una proteína de fibra que carece del dominio knob. Aunque éste puede ser el caso, pueden faltar también otras regiones de la fibra, tales como el dominio de tallo o parte del mismo. Una proteína de espícula de adenovirus quimérico de la presente invención puede comprender además secuencias adicionales, tales como secuencias de direccionamiento y/o secuencias espaciadoras/enlazadoras. El dominio de "trimerización" de la proteína de fibra está ubicado, tal como se mencionó, en el dominio knob. Si el dominio knob se elimina de la fibra creando de ese modo una fibra no knob, es preferente que la función de trimerización perdida la sustitución otras secuencias que comprenden un denominado "dominio de trimerización". De lo contrario, no se forman trímeros y no se incorporan fibras en la partícula de adenovirus. Se han producido en la técnica diferentes dominios de trimerización para sustituir el dominio de trimerización de adenovirus. Pueden derivarse dominios de trimerización heterólogos de muchas clases diferentes de proteínas. Ejemplos no limitativos de proteínas de fibra sin knob de la presente invención se describen en el
 30 documento WO01/81607, en el documento WO01/02431 y en el documento WO 98/54346.

El dominio "cola" de la fibra proporciona la función de unión de la fibra a la cápsida del adenovirus. Esta función de unión se proporciona mediante una secuencia de localización nuclear, para transportar la fibra al núcleo en el que se ensamblan las partículas de adenovirus, y una secuencia de reconocimiento para unir la fibra a las proteínas de la base del pentón en la cápsida del adenovirus. Es preferente que una fibra sin knob se la presente invención comprenda, como mínimo, una parte funcional de este dominio cola, en el que funcional significa proporcionar capacidad de unión a la cápsida del adenovirus cuando se expresa en una célula. Por tanto, una fibra sin knob de la presente invención comprende preferentemente un dominio "cola" de la fibra de adenovirus y un dominio de trimerización heterólogo y/o que no es de adenovirus. Para los medios y el método para producir adenovirus que contienen fibras sin knob, se hace referencia al documento WO01/81607.

Se generan vectores adenovirales recombinantes mediante una variedad de técnicas que incluyen introducir un gen de interés deseado en un plásmido bacteriano en un sitio flanqueado por secuencias de adenovirus. Estas secuencias proporcionan elementos de control para la expresión génica y sirven como sitios para la recombinación con un genoma adenoviral compatible cuando se cotransfectan juntos en una línea celular de mamíferos apropiada (Horwitz, M. S., "Adenoviruses," en Fields Virology, tercera edición, editado por B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley y otros, Lippincott-Raven Publishers: Filadelfia, Pa. (1996)).

50 Por tanto, la presente invención contempla la utilización de cualquier serotipo adenoviral conocido en la técnica e incluyendo, sin limitación, cualquiera de los serotipos definidos en la tabla 1.

Tabla 1: Algunos subgrupos y serotipos adenovirales a modo de ejemplo adecuados para su utilización como nanotransportadores en la presente invención.

Subgrupo	Serotipos
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35
C	1, 2, 5, 6
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-47
E	4
F	40,41

55 En una realización preferente, el adenovirus pertenece al serotipo 5 (Ad5) y se ha modificado incorporando la proteína de fibra corta del adenovirus 40 (denominado a continuación en el presente documento Ad5/40).

b. Nanotransportadores basados en VLP

En una realización, el nanotransportador utilizado en la presente invención es una VLP. La expresión “VLP o partícula de tipo viral”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una estructura macromolecular autoensamblante formada por las nucleocápsidas virales que adquieren una estructura cuaternaria que se asemeja a la del virus del que se originan pero que carecen del material genético del virus.

Las VLP para su utilización según la presente invención pueden formarse a partir de polipéptidos derivados de cualquier virus conocido en la técnica que tenga una estructura ordenada y repetitiva. Las VLP pueden producirse y purificarse a partir de cultivos celulares infectados con virus. El virus o partícula similar a un virus resultante para el fin de vacuna necesita estar desprovisto de virulencia. Además de la ingeniería genética, pueden emplearse métodos físicos o químicos para inactivar la función del genoma viral, tales como irradiación UV, tratamiento con formaldehído. Alternativamente, la VLP es una VLP recombinante. El experto apreciará que casi todos los virus comúnmente conocidos de secuencia conocida pueden utilizarse para la generación de VLP siempre que el gen que codifica la proteína o proteínas de la cubierta pueda identificarlo fácilmente un experto en la técnica. La preparación de VLP mediante la expresión recombinante de la proteína o proteínas de la cubierta en un huésped está dentro del conocimiento común de un experto en la técnica. Pueden obtenerse VLP adecuadas a partir de las proteínas de la nucleocápsida de un virus seleccionado del grupo que consiste en bacteriófagos de ARN, adenovirus, virus del mosaico de la papaya, virus de la gripe, norovirus, papilomavirus, hepadnavirus, virus respiratorio sincitial, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión; virus Sindbis; rotavirus, virus de la fiebre aftosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Norwalk, alfavirus; SARS, paramixovirus, retrovirus del virus de la gastroenteritis transmisible, retrotransposición Ty, poliomavirus; virus del mosaico del tabaco; virus del escarabajo neozelandés (virus flock house), virus del moteado clorótico del caupí; virus del mosaico del caupí; y virus del mosaico de la alfalfa.

El ensamblaje apropiado del fragmento o mutante de la proteína recombinante o proteína de la cubierta en una VLP puede someterse a prueba, tal como apreciaría un experto en la técnica, expresando la proteína en *E. coli*, opcionalmente purificando las cápsidas mediante filtración en gel a partir de lisado celular, y analizando la formación de la cápsida en un ensayo de inmunodifusión (prueba de Ouchterlony) o mediante microscopía electrónica (ME) (Kozlovska, T. M. y otros, Gene 757:133-37 (1993)). Los ensayos de inmunodifusión y la ME pueden realizarse directamente en lisado celular.

c. Nanotransportadores basados en armazones proteicos

En otra realización, el nanotransportador utilizado en la presente invención es un armazón proteico. La expresión “armazón proteico”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una estructura macromolecular autoensamblante formada por una o más proteínas diferentes que pueden formar un entorno interno constreñido. Los armazones proteicos pueden tener diferentes tamaños de núcleo, que oscilan desde 1 hasta 30 nm (por ejemplo, el diámetro interno de las envueltas). Los armazones proteicos preferentes adecuados para su utilización en la presente invención incluyen armazones proteicos de ferritina, armazones de proteínas de choque térmico tal como se describen en el documento WO08124483 y similares.

d. Nanotransportadores basados en nanopartículas

En otra realización, los nanotransportadores son nanopartículas. Éstas incluyen nanopartículas lipídicas así como nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas están formadas por una matriz polimérica que está unida al resto de direccionamiento de la fibra corta adenoviral. Los ejemplos no limitativos de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en las nanopartículas poliméricas según la presente invención incluyen polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumaratos, policaprolactonas, poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, (alcoholes polivinílicos), poliuretanos, polifosfacenos, poliácridatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos, o poliaminas, poliglutamato, dextrano, polianhídridos, poliuretanos, polimetacrilatos, poliácridatos o policianoacrilatos, polidioxanona (PDO), polihidroxicanoato, polihidroxitirato, poli(sebacato de glicerilo), poliglicólida, polilactida, PLGA, policaprolactona o combinaciones de los mismos.

Alternativamente, las nanopartículas de la presente invención pueden ser nanopartículas lipídicas, tales como un liposoma o una micela. La formación de micelas y liposomas a partir de, por ejemplo, lípidos que forman vesículas, se conoce en la técnica. Lípidos que forman vesículas se refiere a lípidos que forman espontáneamente bicapas lipídicas por encima de su intervalo de temperatura de transición de fases cristalinas de gel a líquido. Tales lípidos tienen normalmente ciertas características que permiten la formación espontánea de bicapas, tales como zonas de sección transversal de cercana a idéntica de sus partes hidrófobas e hidrófilas que permiten su empaquetamiento en fases lamelares. Lípidos que pueden incorporarse de manera estable en bicapas lipídicas, tales como colesterol y sus diversos análogos, pueden incorporarse en la bicapa lipídica durante la formación de la bicapa. Los lípidos que forman vesículas son preferentemente lípidos que tienen dos cadenas hidrocarbonadas, normalmente cadenas de acilo, y un grupo principal, o bien polar o bien no polar. Hay una variedad de lípidos sintéticos que forman vesículas y lípidos que forman vesículas que se producen de manera natural, incluyendo los fosfolípidos, tales como

fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol y esfingomielina, en los que las dos cadenas hidrocarbonadas tienen normalmente entre aproximadamente 14-22 átomos de carbono de longitud, y o bien están saturadas o bien tienen grados variables de insaturación. Los lípidos y fosfolípidos descritos anteriormente cuyas cadenas de acilo tienen grados variables de saturación pueden obtenerse comercialmente o prepararse según métodos publicados. Otros lípidos adecuados incluyen fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos y esteroides, tales como colesterol.

Los nanotransportadores poliméricos y lipídicos pueden incluir adicionalmente un recubrimiento de un compuesto anfílico que rodea el material polimérico formando una envuelta para la partícula o un material de ocultación que puede permitir que las partículas evadan su reconocimiento por componentes del sistema inmunitario y aumente la semivida de circulación de la partícula. El compuesto anfílico puede ser, pero sin limitación a los mismos, uno o una pluralidad de los siguientes: lípidos derivados de manera natural, surfactantes o compuestos sintetizados con ambos restos hidrófilo e hidrófobo. El disolvente miscible con agua puede ser, pero sin limitación a los mismos, acetona, etanol, metanol y alcohol isopropílico. Por separado, se mezcla un material polimérico biodegradable con el agente o agentes que van a encapsularse en un disolvente orgánico miscible con agua o parcialmente miscible con agua. En una realización preferente, el polímero biodegradable puede ser cualquiera de los polímeros biodegradables dados a conocer en el presente documento, por ejemplo, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D,L-glicólico), poli(épsilon-caprolactona), o sus copolímeros a diversas razones molares. Por ejemplo, los nanotransportadores pueden incluir un conjugado de polímero-poli(etilenglicol) o de lípido-poli(etilenglicol), para proporcionar un recubrimiento de la superficie externa de cadenas poliméricas. El polímero de poli(etilenglicol) es a modo de ejemplo, y son adecuados y se contemplan otros polímeros. La preparación de un lípido que forma vesículas derivado de un polímero hidrófilo para formar un lipopolímero se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU número 5.013.556. Se apreciará también que el nanodispositivo polimérico o lipídico puede formarse a partir de múltiples capas del mismo material o uno diferente.

B. LA PROTEÍNA DE FIBRA CORTA ADENOVIRAL DEL SUBGRUPO F

Los nanotransportadores de la presente invención contienen como resto de direccionamiento la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F. La expresión "adenovirus del subgrupo F", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un grupo de virus también conocido como adenovirus entéricos caracterizados porque, en contraposición a otros adenovirus, no dependen de la interacción entre motivos RGD en la proteína de fibra y el receptor de integrina en la superficie de la célula diana para la entrada en la célula. En su lugar, los adenovirus del subgrupo F pueden utilizar un mecanismo alternativo para facilitar la endocitosis. En contraposición a todas las otras especies de adenovirus humano, los adenovirus entéricos se caracterizan también porque poseen dos proteínas de fibra diferentes, ambas de las cuales se encuentran en cada virión en números aproximadamente iguales. Hay una fibra larga, que se ha mostrado que se une al virus de coxsackie B y al receptor de adenovirus (CAR) y, adicionalmente, una fibra corta que no se une a CAR, y es de función desconocida. Es posible que estas dos propiedades únicas de adenovirus entéricos, concretamente la ausencia de un motivo RGD en la base del pentón y la presencia inusual de una segunda fibra estén relacionadas con la capacidad especial de estos virus para infectar células en el sistema gástrico humano. Características adicionales de los adenovirus entéricos son el punto isoeléctrico relativamente alto de sus proteínas estructurales, el aumento de viabilidad tras la exposición a un entorno ácido (tal como se encuentra en partes del tubo gástrico) y su capacidad para unirse a ciertos lípidos comúnmente encontrados en la mucosa gástrica, especialmente tras la exposición a un pH bajo. La presente invención puede llevarse a cabo utilizando cualquier proteína de fibra corta de los serotipos Ad40 (SEQ ID NO:1) o Ad41 (SEQ ID NO:2). En una realización preferente, la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F es la proteína de fibra corta de Ad40.

En la presente invención, el término "como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F" se refiere a cualquiera de los dominios de la proteína de la fibra corta de un adenovirus del subgrupo F que conserva la funcionalidad de direccionamiento de la proteína completa. Fragmentos de la proteína de fibra corta adecuados incluyen, como mínimo, el dominio knob de una proteína de la fibra corta de un adenovirus del grupo F. El dominio de cola de Ad40 corresponde a los aminoácidos 1 a 42 de la secuencia SEQ ID NO:1, el dominio tallo de Ad40 corresponde a los aminoácidos 43 a 233 de la secuencia SEQ ID NO:1 y el dominio knob de Ad40 corresponde a los aminoácidos 234 a 387 de la secuencia SEQ ID NO:1. El dominio de cola de Ad41 corresponde a los aminoácidos 1 a 42 de la secuencia SEQ ID NO:2, el dominio tallo de Ad41 corresponde a los aminoácidos 43 a 233 de la secuencia SEQ ID NO:2 y el dominio knob de Ad41 corresponde a los aminoácidos 234 a 387 de la secuencia SEQ ID NO:2.

La persona experta en la materia apreciará que el nanotransportador de la presente invención puede también contener como restos de direccionamiento proteínas de fibra híbridas que comprenden la región de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F que es capaz de dirigir el nanotransportador a las células CD14+ y una región de una adenovirus de un subgrupo diferente. En una realización preferente, dicho grupo de adenovirus diferente es un adenovirus del subgrupo C y, más preferentemente un adenovirus 1, 2, 5 ó 6. Así, la proteína de fibra corta utilizada en los nanotransportadores de la presente invención puede estar formada por una proteína de fusión de un dominio knob y dominio tallo de la fibra corta de un adenovirus del subgrupo F (Ad40 o Ad41) y las regiones de cola de un adenovirus del subgrupo F (por ejemplo Ad5). En una realización, aun más preferente, la proteína de

fibra corta contiene las regiones cola, tallo y knob de una proteína de fibra corta de un subgrupo F, más preferentemente, de Ad40 o Ad41.

5 La presente invención se refiere además a variantes funcionalmente equivalentes de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F. La expresión "variante funcionalmente equivalente" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a polipéptidos que son resultado de la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos con respecto a la proteína de fibra corta nativa y que mantiene sustancialmente la actividad biológica de la proteína de fibra corta. La variante puede tener cambios "conservativos", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades químicas o estructurales similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina. 10 Alternativamente, una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Las variaciones minoritarias análogas pueden incluir también la delección o inserción de aminoácidos, o ambas. Las variantes de la proteína de fibra del adenovirus del subgrupo F tienen preferentemente una identidad de secuencia con la proteína de fibra de adenovirus de, como mínimo el 50%, como mínimo el 60%, como mínimo el 70%, como mínimo el 80%, como mínimo el 90%, como mínimo el 91%, como mínimo el 92%, como mínimo el 93%, 15 como mínimo el 94%, como mínimo el 95%, como mínimo el 96%, como mínimo el 97%, como mínimo el 98% o como mínimo el 99%. El grado de identidad entre las variantes y el ligando natural se determina utilizando métodos y algoritmos informáticos que conocen ampliamente los expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácido se determina utilizando el algoritmo BLASTP (BLASTManual, Altschul, S., y otros, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., y otros, J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990) aunque también pueden utilizarse otros 20 algoritmos similares.

Un ensayo adecuado para determinar si una determinada variante de una proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F es una variante funcionalmente equivalente de la misma es, por ejemplo, el método tal y como se describe en el ejemplo 4 de la presente invención basado de la habilidad de la proteína variante de fibra corta para 25 dirigir un adenovirus quimérico, cuya proteína es la variante de proteína de fibra corta, a células CD14+ (por ejemplo, un monocito o un macrófago).

La proteína de fibra corta actúa como resto de direccionamiento para el nanotransportador y, por tanto, debe estar presente en la superficie exterior del nanotransportador. La proteína de fibra corta puede acoplarse al nanotransportador una vez que se ha formado o, alternativamente, puede incorporarse en la secuencia de las unidades de nanotransportador de modo que, tras el ensamblaje del nanotransportador, aparecerá en la superficie exterior. 30

En el caso en el que la proteína de fibra corta se añada al nanotransportador preformado, esto puede realizarse añadiendo grupos funcionales al nanotransportador para su unión posterior a restos adicionales. Grupos funcionales preferentes para la unión son grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo y grupos tiol. Estos grupos funcionales pueden unirse entonces, directa o bien indirectamente, a través de la utilización de un enlazador. Los enlazadores se conocen bien en la técnica; por ejemplo, se conocen bien enlazadores homo o heterobifuncionales (véase el catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre agentes reticulantes, páginas 155-200, así como el catálogo 2003, ambos de los cuales se incorporan al presente documento como referencia). Los enlazadores preferentes incluyen, pero sin limitación a los 35 mismos, grupos alquilo (incluyendo grupos alquilo sustituidos y grupos alquilo que contienen restos de heteroátomos), siendo preferentes grupos alquilo cortos, ésteres, grupos amida, amina, epoxi y etilenglicol y derivados, siendo preferentes especialmente propilo, acetileno y alqueno C2. 40

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo para dar los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos "-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. 45

Otro tipo de modificación covalente de los nanotransportadores, si es apropiado, comprende alterar el patrón de glicosilación nativo de los polipéptidos que forman dicho nanotransportador. La expresión "alterar el patrón de glicosilación nativo" pretende significar para los fines del presente documento la delección de uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en la secuencia nativa del monómero del armazón, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa. 50

La adición de sitios de glicosilación a los polipéptidos del armazón puede conseguirse alterando la secuencia de aminoácidos de los mismos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de uno o más residuos de serina o treonina o la sustitución por los mismos en el polipéptido de secuencia nativa (para sitios de glicosilación O-unidos). La secuencia de aminoácidos puede alterarse opcionalmente a través de cambios al nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. Otros medios de aumento del número de restos de hidratos de carbono en el polipéptido son mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981). 55 60 65

La eliminación de restos de hidratos de carbono presentes en el polipéptido puede conseguirse química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican para residuos de aminoácido que sirven como dianas para la glicosilación. Se conocen en la técnica técnicas de desglicosilación químicas y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, y otros, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y por Edge y otros, Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos puede lograrse mediante la utilización de una variedad de endo y exoglicosidasas tal como describen Thotakura y otros, Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de restos de nanotransportador comprende unir el polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de EE.UU. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Esto encuentra una utilización particular en el aumento de la semivida fisiológica de la composición.

En aquellas realizaciones en las que el nanotransportador es un nanotransportador lipídico, la unión de la proteína de fibra corta se lleva a cabo a través de medios químicos, tales como hacer reaccionar lípidos activados, tales como PE-malimida para activar aminas libres de un anticuerpo con agentes, tales como reactivo de Traut. Puede incorporarse entonces la proteína de fibra corta conjugada a lípidos en la nanopartícula lipídica.

Los polipéptidos que forman los nanotransportadores de la presente invención también pueden modificarse de modo que se creen moléculas quiméricas que comprenden parte de toda la proteína nanotransportadora y la proteína de fibra corta o una variante de la misma. Esto se lleva a cabo habitualmente fusionando la proteína de fibra corta al extremo N o C-terminal del polipéptido que puede formar el nanotransportador. Alternativamente, la proteína de fibra corta puede colocarse dentro de un bucle interno del constituyente nanotransportado. Preferentemente, el bucle interno se elige de modo que, tras el ensamblaje del nanotransportador, la proteína de fibra corta se expone en la superficie exterior del nanotransportador. En una realización, una molécula quimérica de este tipo comprende una fusión de un polipéptido nanotransportador (proteína de la cápsida viral, componente de VLP, componente de armazón proteico y similar) con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítipo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo de un polipéptido de armazón puede detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el polipéptido de armazón se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la etiqueta de epítipo.

Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field y otros, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 frente a la misma [Evan y otros, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky y otros, Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp y otros, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin y otros, Science, 255: 192-194 (1992)]; el péptido de epítipo de la tubulina [Skinner y otros, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y la etiqueta de péptido de la proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

El número de proteínas de fibra corta en cada nanotransportador no es limitativo en la presente invención siempre que se logre un direccionamiento eficaz de los nanotransportadores hacia las células CD14⁺ diana. Por consiguiente, el nanotransportador puede comprender desde tan sólo 1 proteína de fibra corta hasta tantas como varios miles. Se apreciará que, dependiendo del método utilizado para la preparación de los nanotransportadores, será posible ajustar el número de proteínas de fibra corta. Por tanto, si los nanotransportadores modificados con proteínas de fibra corta se obtienen mediante acoplamiento químico de la proteína de fibra corta a un nanotransportador activado, será posible obtener un número variable de proteínas de fibra corta en la superficie del nanotransportador dependiendo de la proporción de proteína de fibra corta con respecto a nanotransportador utilizada durante la reacción de acoplamiento. Cuando la proteína de fibra corta se une al nanotransportador a través de interacciones específicas entre parejas de unión presentes en la proteína de fibra corta y el nanotransportador, será posible ajustar el número de proteínas de fibra corta en el nanotransportador añadiendo un número variable de parejas de unión en los monómeros que forman el nanotransportador.

C. USOS *IN VITRO* DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCION

Los nanotransportadores de la presente invención, en virtud de la presencia en su superficie de la proteína de fibra corta adenoviral, muestran una afinidad alta y selectiva hacia células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, hacia células mononucleares CD14⁺. Por tanto, los nanotransportadores son particularmente adecuados para suministrar el contenido de los nanotransportadores a células mononucleares del linaje de monocitos-macrófagos. Por tanto, en la presente memoria descriptiva se da a conocer un método *in vitro* para suministrar un compuesto de interés a una célula del linaje de monocitos-macrófagos que comprende poner en

contacto dicha célula con un nanotransportador que porta dicho compuesto de interés y en el que el transportador contiene, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

5 En una primera etapa, el método *in vitro* de la presente invención comprende poner en contacto el nanotransportador con una célula del linaje de monocitos-macrófagos. La expresión “una célula del linaje de monocitos-macrófagos”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a células positivas CD14+ derivadas de monoblastos.

10 El término “monoblasto” tal y como se utiliza en el presente documento se refiere a un tipo de células madre hematopoyéticas de alrededor de 12 a 20 µm de diámetro que presenta una relación entre el citoplasma y el núcleo de cerca de 4:1 a 3:1, y, de manera similar a la mayoría de blastos mieloides, presenta un núcleo de redondo a ovalado con una estructura de cromatina fina. De uno a cuatro núcleos son visibles normalmente. El monoblasto es la primera etapa de la maduración monocito-macrófago. Las etapas de desarrollo de los monoblastos son: CFU-GM (hemocitoblasto o célula madre hematopoyética pluripotencial), monoblasto, promonocito, monocito y macrófago. Células CD14+ derivadas de monoblastos incluye, sin limitación, monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides.

15 El término “monocito”, tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un tipo de glóbulos blancos que tienen dos funciones principales en el sistema inmune: (1) reponer los macrófagos residentes y las células dendríticas bajo estados normales y (2) en respuesta a señales inflamatorias, los monocitos se pueden mover rápidamente (aprox. 8-12 horas) hacia las zonas de infección en los tejidos y dividirse/diferenciarse en macrófagos y células dendríticas para provocar una respuesta inmune. La mitad de ellos son almacenados en el bazo. Los monocitos se identifican normalmente por sus grandes núcleos bilobulados en extensiones teñidas. Además de la expresión de CD14, los monocitos también muestran la expresión de uno o más de los siguientes marcadores de superficie 125I-WVH-1, 63D3, Adipofilina, CB12, CD11a, CD11b, CD15, CD54, Cd163, citidina desaminasa, Flt-1, y similares.

20 El término monocito incluye, sin limitación, tanto el monocito clásico como el monocito proinflamatorio no clásico, ambos presentes en la sangre humana.

25 El término “el monocito clásico”, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un tipo de célula monocito caracterizada por el alto nivel de expresión del receptor de superficie celular CD14 (monocito CD14++) y el término “el monocito proinflamatorio no clásico”, tal y como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un célula con bajo nivel de expresión de CD14 y con la coexpresión adicional del receptor CD16 (monocito CD14+CD16+) los cuales se caracterizan por producir altas cantidades de citoquinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral e interleuquina-12 en respuesta a la estimulación por productos microbianos. Estas células derivan de los monocitos CD14++.

30 El término “macrófago”, como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a células CD14+ positivas derivadas tras diferenciación de los monocitos y caracterizadas por ser fagocitos, actuando tanto en la defensa no específica (inmunidad innata) como en ayudar a iniciar los mecanismos de defensa específicos (inmunidad adaptativa) de los animales vertebrados. Su papel es fagocitar (engullir y a continuación digerir) los restos celulares y patógenos ya sea como células fijas o móviles y estimular a los linfocitos y otras células inmunes para responder ante el patógeno.

35 Además de la expresión de CD14, los macrófagos también muestran la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD11b, F4/80(ratones)/EMR1(humano), Lisozima M, MAC-1/MAC-3, 27E10, Carboxipeptidasa M, Catepsina K, CD163 y CD68. Estos marcadores pueden ser determinados por citometría de flujo o tinción inmunohistoquímica.

40 El término “célula dendrítica mieloides” tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una población de células dendríticas las cuales derivan de monocitos y los cuales incluyen, sin limitación, mDC-1 y mDC-2. Además de la expresión de CD14, las células dendríticas mieloides también muestran la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: ADAM19, BDCA-2, CDa, CD11c, CD21, CD86, CD208, Clusterina, Receptor de estrógenos alfa.

45 La etapa de puesta en contacto puede llevarse a cabo utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica y dependerá del tipo de células que está seleccionándose. El método contempla la utilización de cualquier nanotransportador adecuado tal como se definió en la sección anterior. Por tanto, la célula del linaje de monocitos-macrófagos puede ponerse en contacto con un virus, una VLP, un armazón proteico o una nanopartícula siempre que el nanotransportador se modifique con la proteína de fibra corta adenoviral. En una realización preferente, el nanotransportador es un adenovirus y, más preferentemente, un adenovirus de serotipo 5. Además, el nanotransportador puede contener cualquier proteína de fibra corta de adenovirus del subgrupo F tal como se definió anteriormente. En una realización preferente, la proteína de fibra corta es la proteína de fibra corta de Ad40.

50

55

60

65

Los nanotransportadores pueden utilizarse para suministrar un producto de interés a células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, a células mononucleares sanguíneas que expresan CD14+, tales como monocitos y macrófagos. El método *in vitro* según la presente invención es también adecuado para suministrar un compuesto de interés a líneas celulares establecidas monocíticas o similares a macrófagos, tales como THP-1, U-937 y RAW 264.7. Además, el método *in vitro* de la presente invención también puede utilizarse para suministrar un compuesto de interés a células dendríticas derivadas de monocitos.

D. USOS DIAGNÓSTICOS DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCION

Los nanotransportadores de la presente invención pueden utilizarse también para suministrar agentes de obtención de imágenes a células del linaje de monocitos-macrófagos, facilitando así su posterior identificación y cuantificación en muestras biológicas. En una realización preferente, los nanotransportadores de la presente invención se utilizan para la detección de células mononucleares CD14+ dado que los recuentos de monocitos alterados están asociados habitualmente con diferentes enfermedades, tales como inflamación crónica, respuesta al estrés, hiperadrenocorticismos, enfermedad mediada por el sistema inmunitario, mononucleosis infecciosa, enfermedad piogranulomatosa, necrosis, regeneración de glóbulos rojos y fiebre viral. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con un recuento anómalo de células mononucleares sanguíneas CD14+ que comprende poner en contacto la célula mononuclear sanguínea CD14+ con un nanotransportador de la presente invención cargado previamente con un compuesto detectable y detectar las células mononucleares sanguíneas CD14+ siguiendo la pista del compuesto detectable.

Los métodos de diagnóstico que utilizan los nanotransportadores de la presente invención implican habitualmente aislar células sanguíneas del paciente, poner en contacto las células sanguíneas con un nanotransportador cargado con agente para la obtención de imágenes según la presente invención y cuantificar el porcentaje de células sanguíneas en las que se detecta el agente para la obtención de imágenes. En otra realización, los conjugados de diagnóstico o de obtención de imágenes pueden administrarse al paciente como una composición de diagnóstico que comprende un conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable y después de eso pueden recogerse células sanguíneas del paciente para cuantificar el porcentaje de monocitos. En esta realización, la composición se formula normalmente para administración parenteral y se administra al paciente en una cantidad eficaz para permitir la obtención de imágenes de monocitos. Los agentes para la obtención de imágenes adecuados para su utilización en los métodos de diagnóstico incluyen compuestos radiomarcados (por ejemplo, tecnecio, galio, indio y radionúclidos que emiten positrones o agente de obtención de imágenes por PET) y cromóforos, tales como, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, ficoeritrina, verde Oregón, AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oreg.), Cy3, Cy5, Cy7 y similares.

El diagnóstico se produce normalmente antes del tratamiento. Sin embargo, en los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento, el término "diagnóstico" también puede significar la monitorización del estado patológico antes, durante o tras el tratamiento para determinar la evolución del estado patológico. La monitorización puede producirse antes, durante o tras el tratamiento, o combinaciones de los mismos, para determinar la eficacia de la terapia, o para predecir futuros episodios de la enfermedad. La obtención de imágenes puede llevarse a cabo mediante cualquier método de obtención de imágenes adecuado conocido en la técnica, tal como obtención de imágenes intravitales.

El método de diagnóstico contempla la utilización de cualquier nanotransportador adecuado tal como se definió en la sección anterior. Por tanto, la célula del linaje de monocitos-macrófagos puede ponerse en contacto con un virus, una VLP, un armazón proteico o una nanopartícula siempre que el nanotransportador se modifique con la proteína de fibra corta adenoviral. En una realización preferente, el nanotransportador es un adenovirus y, más preferentemente, un adenovirus de serotipo 5. Además, el nanotransportador puede contener cualquier proteína de fibra corta de adenovirus del subgrupo F tal como se definió anteriormente. En una realización preferente, la proteína de fibra corta es la proteína de fibra corta de Ad40.

E. USOS MÉDICOS DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCION

La interacción eficaz y específica de los nanotransportadores de la presente invención con células del linaje de monocitos-macrófagos permite la utilización de dichos nanotransportadores para el tratamiento de cualquier enfermedad en la que es deseable suministrar un compuesto de interés a células del linaje de monocitos-macrófagos. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su utilización en medicina.

Según la presente invención, un "producto de interés" tal y como se define en el presente documento, se refiere a cualquier agente ("carga útil") ("payload"), incluyendo, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ejemplo agentes anticancerígenos), agentes de diagnóstico (por ejemplo, agentes de contraste; radionúclidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo vacunas) y/o agentes nutracéuticos (por ejemplo vitaminas, minerales, etc.) mediante los nanotransportadores de la presente invención. Agentes a modo de ejemplo que van a suministrarse según la presente invención incluyen, pero sin limitación a los mismos, moléculas pequeñas

(por ejemplo agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ADNc, ARNip, ARNi y microARN), proteínas (por ejemplo anticuerpos), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, compuestos y elementos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente que va a suministrarse es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En una realización particular, el fármaco u otra carga útil se libera de una manera de liberación controlada a partir de la partícula y se deja interaccionar localmente con el sitio de selección como diana particular (por ejemplo, un tumor). La expresión "liberación controlada" (y variantes de esa expresión) tal como se utiliza en el presente documento (por ejemplo en el contexto de "sistema de liberación controlada" pretende abarcar generalmente la liberación de una sustancia (por ejemplo, un fármaco o una proteína) en un sitio seleccionado o de otra forma en una cantidad, un intervalo y/o una velocidad controlables. La liberación controlada abarca, pero sin limitación necesariamente a los mismos, un suministro sustancialmente continuo, un suministro en patrón (por ejemplo, suministro intermitente a lo largo de un periodo de tiempo que está interrumpido por intervalos de tiempo regulares o irregulares) y el suministro de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo, como una cantidad predeterminada, diferenciada si se suministra una sustancia a lo largo de un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, unos cuantos segundos o minutos). Por ejemplo, una parte de direccionamiento puede provocar que las partículas se localicen en un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del cuerpo de un sujeto, dependiendo del resto de direccionamiento utilizado. Por ejemplo, un resto de direccionamiento, por ejemplo un aptámero, puede localizarse en células de cáncer de próstata.

En realizaciones particulares, el agente que va a suministrarse es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARNip, ARNhc, microARN, ribozimas, plásmidos de ADN, aptámeros, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos aleatorizados o ribozimas naturales o no naturales.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un agente auxiliar de formulación, material de encapsulación, diluyente o carga líquida, semisólido o sólido, inerte, no tóxico de cualquier tipo. Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. por Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 da a conocer diversos vehículos utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación a los mismos, azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; detergentes, tales como TWEEN™ 80; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y también pueden estar presentes en la composición disoluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y de perfume, conservantes y antioxidantes, según el juicio del formulador. Si no son viables la filtración u otros métodos de esterilización terminal, las formulaciones pueden fabricarse en condiciones asépticas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse a un paciente mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo las vías oral y parenteral. Según tales realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), por vía rectal, por vía vaginal, por vía tópica (tal como mediante polvos, cremas, pomadas o gotas) o mediante inhalación (tal como mediante pulverizadores).

En una realización particular, los nanotransportadores de la presente invención se administran a un sujeto que los necesita de manera sistémica, por ejemplo mediante inyección o infusión i.v. Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones oleaginosas o acuosas inyectables estériles según la técnica conocida utilizando agentes de suspensión y agentes humectantes o de dispersión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una emulsión, suspensión o disolución inyectable estéril en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijado insípido que incluya mono o diglicéridos sintéticos. Además, se utilizan ácidos grasos, tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. En una realización, el conjugado de la presente invención se suspende en un fluido vehículo que comprende carboximetilcelulosa de sodio al 1% (p/v) y TWEEN™ 80 al 0,1% (v/v). Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o mediante la incorporación de agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su utilización.

Las composiciones para administración rectal o vaginal pueden ser supositorios que pueden prepararse mezclando el conjugado de la presente invención con vehículos o excipientes no irritantes adecuados, tales como manteca de

cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por tanto se funden en la cavidad de la vagina o el recto y liberan el conjugado de la presente invención.

5 Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, pulverizadores, inhalantes o parches. El conjugado de la presente invención se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que pueda requerirse. Se contempla también que formulaciones oftálmicas, gotas de los oídos y gotas oculares estén dentro del alcance de la presente
10 invención. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de los conjugados de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al organismo. Tales formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispensando los conjugados de la presente invención en un medio apropiado. También pueden utilizarse potenciadores de la absorción para
15 aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse o bien proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando los conjugados de la presente invención en un gel o una matriz de polímero. Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de los conjugados inventivos de la presente invención, excipientes, tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de los mismos. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos. Cuando se administra por vía oral, el nanotransportador de la presente invención puede encapsularse, aunque no necesariamente. Se conoce en la técnica una variedad de sistemas de encapsulación adecuados ("Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy", editado por Doubrow, M., CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz y Langer J. Control. Release 5:13, 1987; Mathiowitz y otros, Reactive Polimers 6:275, 1987; Mathiowitz y otros, J. Appl. Polimer Sci. 35:755, 1988; Langer Ace. Chem. Res. 33:94,2000; Langer J. Control. Release 62:7,1999; Uhrich y otros, Chem. Rev. 99:3181,1999; Zhou y otros, J. Control. Release 75:27, 2001; y Hanes y otros, Pharm. Biotechnol. 6:389,1995). Los conjugados de la presente invención pueden encapsularse dentro de liposomas o microesferas poliméricas biodegradables. Los ejemplos de polímeros naturales y sintéticos útiles en la preparación de microesferas biodegradables incluyen hidratos de carbono, tales como alginato, celulosa, polihidroxialcanoatos, poliamidas, polifosfacenos, polipropilfumaratos, poliéteres, poliacetales, policianoacrilatos, poliuretanos biodegradables, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, poli(ortoésteres) y otros poliésteres biodegradables. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos.

35 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las formas de dosificación líquidas adecuadas para administración oral de composiciones de la presente invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de un conjugado encapsulado o no encapsulado, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes de solubilización y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuate, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

45 Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y de perfume. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a cualquier compuesto que sea un modulador no específico de la respuesta inmunitaria. En ciertas realizaciones, el adyuvante estimula la respuesta inmunitaria. Puede utilizarse cualquier adyuvante según la presente invención. Se conoce en la técnica un gran número de compuestos adyuvantes (Allison Dev. Biol. Stand. 92:3-11, 1998; Unkeless y otros, Annu. Rev. Immunol. 6:251-281,1998; y Phillips y otros, Vaccine 10:151-158,1992).

55 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado se mezcla con, como mínimo, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, inerte tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o (a) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes, tales como glicerol, (d) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, (e) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina, (f) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes, tales como arcilla de bentonita y caolín, e (i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación puede comprender también agentes de tamponamiento. Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina llenas duras y blandas

utilizando excipientes, tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envueltas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Se apreciará que la dosificación exacta de la partícula de micela inversa dirigida la elige el médico individual en vista del paciente que va a tratarse, en general, la dosificación y administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz de la partícula dirigida al paciente que está tratándose. Tal como se utiliza en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una partícula dirigida se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Tal como apreciarán los expertos habituales en esta técnica, la cantidad eficaz de la partícula dirigida puede variar dependiendo de factores, tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco que va a suministrarse, el tejido diana, la vía de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de partícula dirigida que contiene un fármaco anticancerígeno podría ser la cantidad que da como resultado una reducción del tamaño del tumor en una cantidad deseada a lo largo de un periodo de tiempo deseado. Los factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico; la edad, el peso y el sexo del paciente que está tratándose; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; las combinaciones de fármacos; las sensibilidades a la reacción; y la tolerancia/respuesta a la terapia.

Los nanotransportadores de la presente invención pueden formularse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una unidad físicamente diferenciada de nanotransportador apropiada para el paciente que va a tratarse. Sin embargo, se entenderá que la utilización diario total de las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico encargado dentro del alcance del juicio médico seguro. Para cualquier nanotransportador, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente o bien en ensayos de cultivo celular o bien en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal se utiliza también para lograr un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Tal información puede utilizarse entonces para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. La toxicidad y eficacia terapéutica de los nanotransportadores puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE50 (la dosis es terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL50 (la dosis es letal para el 50% de la población). La proporción de dosis de efectos tóxicos con respecto a terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la proporción DL50/DE50. Composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden utilizarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su utilización en seres humanos.

El nanotransportador de la presente invención puede utilizarse para suministrar un compuesto de interés a monocitos no diferenciados y no estimulados, células del linaje de monocitos-macrófagos, que incluye células mononucleares sanguíneas CD14+ así como otros tipos de células derivadas de células sanguíneas CD14+ como resultado de procesos de diferenciación o maduración espontánea o inducida y, por tanto, es adecuado para el tratamiento de enfermedades en las que están implicadas tales células. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su utilización en el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Por tanto, en otro aspecto, se da a conocer la utilización de un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.

La expresión "enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos" se refiere a cualquier enfermedad provocada o aumentada por células del linaje de monocitos-macrófagos así como a cualquier enfermedad provocada por una actividad deficiente o un número de células reducido del linaje de monocitos-macrófagos. En una realización preferente, la célula del linaje de monocitos-macrófagos es un monocito o una célula sanguínea mononuclear primaria, en cuyo caso la enfermedad se selecciona del grupo de:

- (i) una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada
- (ii) una enfermedad inflamatoria y
- (iii) una enfermedad caracterizada por una proliferación no deseada de células del linaje de monocitos-macrófagos.

Enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria alterada

La expresión “una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada” se refiere a enfermedades en las que el organismo reacciona de manera anómala frente a agentes infecciosos exógenos sin desencadenar una respuesta inmunitaria completa. La expresión “una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada” también incluye enfermedades en las que el organismo reacciona anormalmente contra componentes endógenos desencadenándose una respuesta inmunitaria que conduce a una enfermedad autoinmunitaria. Preferentemente, la enfermedad es una enfermedad infecciosa o una enfermedad alérgica.

En el caso en el que la respuesta inmunitaria desencadenada por el organismo frente a un agente infeccioso no sea suficiente, pueden utilizarse los nanotransportadores de la presente invención para suministrar péptidos antigénicos del agente infeccioso a células sanguíneas CD14+. Las células CD14+ se diferenciarán en células dendríticas, actuando así como células presentadoras de antígenos y presentando el péptido antigénico a los mediadores de la respuesta inmunitaria humoral y celular. En una realización alternativa, los nanotransportadores de la presente invención pueden utilizarse para suministrar péptidos antigénicos a células dendríticas derivadas de monocitos que actuarán entonces como células presentadoras de antígenos a mediadores de la respuesta inmunitaria humoral y celular. Por tanto, en una realización, los nanotransportadores de la presente invención comprenden péptidos antigénicos o ácidos nucleicos que codifican para dichos péptidos antigénicos. Los péptidos antigénicos adecuados que pueden utilizarse en los nanotransportadores de la presente invención incluyen pero sin limitación a los mismos, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno de diferenciación, un antígeno tumoral, un antígeno embrionario, un antígeno de oncogenes y genes supresores de tumores mutados, un antígeno tumoral único que resulta de translocaciones cromosómicas y/o derivados de los mismos.

Los antígenos virales que pueden provocar una respuesta inmunitaria contra el virus incluyen antígenos de VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humano, (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos o proteína temprana inmediata tal como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tal como gB o derivados del mismo), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus varicela zoster (tal como gpl, II, III e IE63), o de un virus de hepatitis tal como virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno del núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos del núcleo E1, NS3 o NS5), de paramixovirus, tales como virus respiratorio sincitial (tal como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, del virus de la rubéola (tal como proteínas EI y E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo VPH6, 11, 16, 18, eg LI, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células con virus de la gripe, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes rotavirales), y similares (véase Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales).

Los antígenos bacterianos incluyen antígenos, tales como de *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC y adhesinas); antígenos de *S. pyogenes* (tales como proteínas M o fragmentos de las mismas y proteasa C5A); antígenos de *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (tal como invasinas y adhesinas de alto y bajo peso molecular); antígenos de *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo *parapertussis* y *B. bronchiseptica* (tal como pertactina, toxina pertúsica o derivados de las mismas, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias); antígenos de *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSPIO, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD 19 kDa [Rv3763], PPD 38 kDa [Rv0934]); antígenos de *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina del tipo toxina Shiga o derivados de la misma); antígenos de *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivados de la misma); antígenos de *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas clostridiales A o B y derivados de las mismas); antígenos de *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la erliquiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por

ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana externa raras), antígenos de *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; antígenos de *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.* y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levadura, tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*; antígenos de *M. tuberculosis* (tales como Rv2557, Rv2558, RPF: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c de 16 kDa, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1); antígenos de *Chlamydia* (tales como la proteína de alto peso molecular (HWMP), ORF3 (documento EP 366 412), y proteínas putativas de membrana (Pmp); antígenos de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina, el antígeno proteico pneumolisina, y derivados detoxificados mutantes de las mismas); antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo); antígenos de *H. influenzae* no tipificable (tal como OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria, o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de las mismas); antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* (tales como RTS,S, TRAP, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*)

Antígenos fúngicos para su utilización en los nanotransportadores de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, componentes de antígenos fúngicos de *Candida*; antígenos fúngicos de *Histoplasma*, tales como proteína de choque térmico 60 (HSP60) y otros componentes de antígenos fúngicos de *Histoplasma*; antígenos fúngicos criptocócicos, tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígenos fúngicos criptocócicos; antígenos fúngicos de *Coccidioides*, tales como antígenos de esférulas y otros componentes de antígenos fúngicos de *Coccidioides*; y antígenos fúngicos de *Tinea*, tales como tricofitina y otros componentes de antígenos fúngicos de *Coccidioides*.

Los antígenos de protozoos incluyen, pero sin limitación a los mismos, antígenos de *Plasmodium falciparum*, tales como antígenos de superficie del merozoíto, antígenos de superficie del esporozoíto, antígenos de circumsporozoíto, antígenos de superficie de gametocito/gameto, antígeno pf de fase sanguínea, 55/RESA y otros componentes de antígenos de *Plasmodium*; antígenos de *Toxoplasma*, tales como SAG-I, p30 y otros componentes de antígenos de *Toxoplasma*; antígenos de *Schistosoma*, tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígeno de *Schistosoma*; antígenos de *Leishmania major* y otros antígenos de *Leishmania*, tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígenos de *Leishmania*; y antígenos de *Trypanosoma cruzi*, tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígenos de *Trypanosoma*.

El antígeno puede ser un alérgeno o un antígeno ambiental, tal como, pero sin limitarse a, un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural, tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierbas, plantas adventicias y césped), alérgenos de insectos (alérgenos respirables, de la saliva y del veneno), alérgenos de la caspa y del pelo de los animales, y alérgenos alimentarios. Importantes alérgenos del polen de árboles, céspedes y hierbas se originan a partir de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinóles y Platanáceas incluyendo *La. abedul (Betula)*, aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), incluyendo el orden de Poales entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, incluyendo los órdenes de Asterales y Urticales entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alérgenos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacén por ejemplo *Lepidoglyphys*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, aquéllos de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, aquéllos de mamíferos, tales como gato, perro y caballo, aves, alérgenos del veneno incluyendo los que se originan de insectos que pican o muerden, tales como aquéllos del orden taxonómico de Hymenoptera incluyendo las abejas (superfamilia Apidae), avispa y hormigas (superfamilia Formicoidae). Todavía otros antígenos alérgenos que pueden utilizarse incluyen alérgenos de inhalación de hongos, tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

El antígeno puede ser también un antígeno tumoral tal como MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA), ciclofilina b, antígeno asociado al cáncer colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus epítopos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de próstata (PSA) y sus epítopos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- ζ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína,

E-cadherina, α -catenina, 13-catenina, γ -catenina, p120ctn, gp100^{Pme1117}, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), fodrina, conexina 37, idiotipo de Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales, tales como proteínas del virus de papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, Imp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por VEB (EBNA)-1, glicógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo de Ig), glioma (E-cadherina, a-catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p2lras), cáncer biliar (p2lras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma cervicouterino (p53, p2lras), carcinoma de colon (p2lras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado al cáncer colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin (Imp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, MelanA/MART-1, cdc27, MAGE-3, p2lras, gp100^{Pme1117}), mieloma (familia MUC, p2lras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (Imp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), cáncer de próstata (antígeno prostático específico (PSA) y sus epítomos antígenicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales, tales como proteínas del virus de papiloma humano), cáncer testicular (NY-ESO-1) y leucemias de células T (epítomos de VLTH-1).

El experto apreciará que los nanotransportadores cargados con antígeno de la presente invención pueden utilizarse mediante administración directa a un paciente que lo necesita o, alternativamente, pueden utilizarse también para tratamiento *ex vivo*. Para este fin, pueden aislarse monocitos del paciente, ponerse en contacto con los nanotransportadores de la presente invención y, o bien administrarse directamente de nuevo al paciente, o bien, alternativamente, dejar que se diferencien en células dendríticas que se suministrarán, a continuación, al paciente. En la técnica se conocen métodos para promover la diferenciación *in vitro* de monocitos en células dendríticas (por ejemplo utilizando una combinación de GM-CSF e IL-4 o utilizando métodos, tales como los descritos en el documento WO06012359).

En otro aspecto, los nanotransportadores de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un aumento de la respuesta inmunitaria hacia componentes celulares endógenos (es decir, enfermedades autoinmunitarias). Los estados patológicos a modo de ejemplo incluyen fibromialgia, artritis reumatoide, artrosis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, osteomielitis, esclerosis múltiple, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, esclerosis sistémica, rechazo de trasplante de órganos (GVHD), lupus eritematoso, síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, inflamaciones de la piel (por ejemplo, psoriasis) e inflamaciones crónicas. Para este fin, los nanotransportadores se cargan con componentes citotóxicos que conducirán a una reducción en el número de monocitos y, por tanto, a una disminución en el número de células dendríticas. Los compuestos citotóxicos a modo de ejemplo que pueden utilizarse en los nanotransportadores de la presente invención incluyen clodronato, toxina del ántrax, exotoxina de *Pseudomonas*, normalmente modificados de modo que estos restos citotóxicos no se unen a células normales, y otras toxinas o agentes citotóxicos incluyendo agentes quimioterápicos, tales como adrenocorticoides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, estrógenos, antimetabolitos, tales como arabinósido de citosina, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, ciclofosfamida, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxidurea, tenipósido, y bleomicina, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, inhibidores de MEK quinasa, inhibidores de la ruta de MAP quinasa, inhibidores de PI-3-quinasa, perturbadores mitocondriales, inhibidores de la ruta de NFkB, inhibidores de proteosomas, agentes proapoptóticos, glucocorticoides, tales como prednisolona, flumetasona, dexametasona y betametasona, indometacina, diclofenaco, proteínas, tales como de fitolaca, saporina, momordina y gelonina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la síntesis de proteínas, didemnina B, verrucarina A, geldanamycin y similares.

Enfermedades inflamatorias

Se sabe que los monocitos migran a los sitios de inflamación en respuesta a CCL2. Por tanto, la presente invención contempla la utilización de los nanotransportadores de la presente invención para suministrar agentes antiinflamatorios a monocitos que se suministrarán entonces a los sitios de inflamación. Por tanto, los nanotransportadores de la presente invención pueden cargarse con un agente antiinflamatorio y utilizarse para suministrar dicho agente a un sitio de inflamación. Los agentes antiinflamatorios que pueden incorporarse en los nanotransportadores de la presente invención incluyen, sin limitación, agentes antiinflamatorios esteroideos, tales como hidrocortisona, hidroxiltriamicinolona, alfa-metil dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionato de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de flucortolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, éster butílico de flucortina, flucortolona, acetato de fluprednido (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamicinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de triamfenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el equilibrio de sus ésteres, clorprednisona, acetato de clorprednisona, clocortelona, clescinnolona,

diclorisona, difluprednato, fluclosona, flunisolida, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona y mezclas de los mismos. Los nanotransportadores pueden contener también agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como oxicams (piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam y CP-14.304), salicilatos (aspirina, disalcid, benorilato, trilisato, safaprina, solprina, diflunisal y fendosal), derivados de ácido acético (diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindaco, tolmetina, isoxepaco, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acematacina, fentiazaco, zomepiraco, clidanaco, oxepinaco y felbinaco), fenamatos (ácidos mefenáico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico y tolfenámico), derivados de ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, pirprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, miroprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno y ácido tiaprofénico), pirazoles (fenibutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona y trimetazona), derivados de ácido acrilacético, derivados de ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazonas, tiazincarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetina, bendazaco, bencidamina, bucolomo, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, orgoteina, oxaceprol, parnilina, perisoxal, pifoxima, procuazona, proxazol y tenidap. Las enfermedades inflamatorias que pueden tratarse con los nanotransportadores según la presente invención incluyen, sin limitación, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriásica, artritis asociada a lupus o espondiloartritis anquilosante), esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), enfermedades cutáneas autoinmunitarias, miastenia grave, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, diabetes mellitus (tipo I) y similares.

Enfermedades asociadas con un aumento de proliferación/actividad de células del linaje de monocitos-macrófagos

En otra realización, los nanotransportadores de la presente invención son adecuados para el tratamiento asociado con un aumento de proliferación o actividad de una célula del linaje de monocitos-macrófagos. Estas enfermedades incluyen:

- enfermedades hiperproliferativas del linaje de monocitos/macrófagos
- enfermedades que resultan de un aumento de la producción de interleucina-1 (IL-1) por monocitos y
- enfermedades que resultan de un aumento de la producción de TNF- α por monocitos.

Estas enfermedades pueden tratarse reduciendo el número de monocitos utilizando los nanotransportadores de la presente invención para el suministro de compuestos citotóxicos tal como se definió anteriormente.

En una realización, los nanotransportadores de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de una enfermedad asociada con una proliferación no deseada de células del linaje de monocitos-macrófagos como leucemia monocítica crónica o aguda, leucemia mielomonocítica crónica o aguda y leucemia mielomonocítica juvenil. Las enfermedades hiperproliferativas del linaje de monocitos/macrófagos que pueden tratarse con compuestos citotóxicos suministrados utilizando los nanotransportadores de la presente invención incluyen, entre otras, la mononucleosis.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya está afectado por la enfermedad particular, en una cantidad suficiente para curar o, como mínimo, detener parcialmente el estado y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad, el estado general del paciente y la vía de administración. Pueden suministrarse suspensiones de partículas infecciosas de adenovirus mediante diversas vías, incluyendo intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica y tópica. Puede administrarse una suspensión de adenovirus que contiene de aproximadamente 10^3 a 10^{12} o más partículas de virión por ml mediante infusión u otra vía adecuada. Los nanotransportadores de la presente invención pueden utilizarse para el suministro específico de compuestos citotóxicos, tales como clodronato, toxina del ántrax, exotoxina de *Pseudomonas*, normalmente modificados de modo que estos restos citotóxicos no se unen a células normales, y otras toxinas o agentes citotóxicos incluyendo agentes quimioterápicos reconocidos en la técnica, tales como adrenocorticoides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, estrógenos, antimetabolitos, tales como arabinósido de citosina, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, ciclofosfamida, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxiurea, tenipósido, y bleomicina, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, inhibidores de MEK quinasa, inhibidores de la ruta de MAP quinasa, inhibidores de PI-3-quinasa, perturbadores mitocondriales, inhibidores de la ruta de NF κ B, inhibidores de proteosomas, agentes proapoptóticos, glucocorticoides, tales como prednisolona, flumetasona, dexametasona y betametasona, indometacina, diclofenaco, proteínas, tales como fitolaca, saporina, momordina y gelonina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la síntesis de proteínas, didemina B, verrucarina A, geldanamicina, y similares.

La terapia adenoviral utilizando los adenovirus de la presente invención puede combinarse con un tratamiento simultáneo o secuencial con otros protocolos antineoplásicos, tales como radioterapia, quimioterapia convencional para tratar un cáncer particular. Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados útiles para la

presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracín-diona, mitoxantrona, actinomicina D, 1-deshidro-testosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (antiguamente daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, caliqueamicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)), toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como cadena A de difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas), toxina ricina (tal como ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertúsica, toxina tetánica, inhibidor de proteasas de Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, toxinas gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. Agentes terapéuticos, que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo tal como se describe en otra parte en el presente documento, pueden ser también candidatos para restos terapéuticos útiles para la conjugación a un anticuerpo utilizado en la presente invención. Además, si el compuesto citotóxico es un polipéptido, éste incluye, sin limitación, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-gamma o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), u otros factores de crecimiento y proteína de inducción de apoptosis aislada de mitocondrias.

La terapia adenoviral utilizando los adenovirus de la presente invención como vectores adenovirales puede combinarse también con otros genes que se sabe que son útiles en el tratamiento basado en virus. Véase la patente EE.UU No. 5.648.478. En tales casos, el adenovirus quimérico comprende además un gen heterólogo que codifica una proteína terapéutica, incorporado dentro del genoma viral, de manera que el gen heterólogo se expresa dentro de una célula infectada. Una proteína terapéutica, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una proteína que se espera que proporcionara algún beneficio terapéutico cuando se expresa en una célula dada. En una realización, el gen heterólogo es un gen activador de profármaco, tal como citosina desaminasa (CD) (véanse, patente EE.UU Nos. 5.631.236; 5.358.866; y 5.677.178). En otras realizaciones, el gen heterólogo es un inductor conocido de la muerte celular, por ejemplo apoptina o proteína de muerte adenoviral (ADP), o una proteína de fusión, por ejemplo glicoproteína de membrana fusogénica (Danen-Van Oorschot y otros (1997) Proc. Nat. Acad. Sci. 94:5843-5847; Tollefson y otros (1996) J. Virol. 70:2296-2306; Fu y otros (2003) Mol. Therapy 7: 48-754, 2003; Ahmed y otros (2003) Gene Therapy 10:1663- 1671; Galanis y otros (2001) Human Gene Therapy 12(7): 811-821). Los ejemplos adicionales de genes heterólogos, o fragmentos de los mismos, incluyen aquéllos que codifican para proteínas inmunomoduladoras, tales como citocinas o quimiocinas. Los ejemplos incluyen interleucina 2, patentes EE.UU Nos. 4.738.927 o 5.641.665; interleucina 7, patentes EE.UU Nos. 4.965.195 o 5.328.988; e interleucina 12, patente EE.UU No. 5.457.038; factor de necrosis tumoral alfa, patentes EE.UU Nos. 4.677.063 o 5.773.582; interferón gamma, patentes EE.UU Nos. 4.727.138 o 4.762.791; o GM CSF, patentes EE.UU Nos. 5.393.870 o 5.391.485, Mackensen y otros (1997) Cytokine Growth Factor Rev. 8:119-128). Las proteínas inmunomoduladoras adicionales incluyen además proteínas inflamatorias de macrófagos, incluyendo MIP-3. También puede utilizarse la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-3 alfa); una realización preferente de un gen heterólogo es un gen quimérico que consiste en un gen que codifica una proteína que atraviesa membranas celulares, por ejemplo, VP22 o TAT, fusionado a un gen que codifica una proteína que es preferentemente tóxica para células cancerosas pero no para células normales.

Los adenovirus quiméricos de la presente invención pueden utilizarse también como vectores para suministrar genes que codifican para moléculas de ARN terapéuticamente útiles, es decir ARNip (Dorsett y Tuschl (2004) Nature Rev Drug Disc 3:318-329). En algunos casos, los genes pueden incorporarse en un adenovirus quimérico de la presente invención para potenciar adicionalmente la capacidad del virus oncolítico para desarraigar la célula del linaje de monocitos/macrófagos, aunque no tenga ningún impacto directo sobre la propia célula. Éstos incluyen genes que codifican para ARNip que pueden inhibir la actividad de factores que comprometen la presentación de CMH de clase I, complemento de bloque, inhiben IFN y mecanismos inducidos por IFN, quimiocinas y citocinas, destrucción basada en células NK, regulación por disminución de la respuesta inmunitaria (por ejemplo IL-10, TGF-Beta) y metaloproteasas que pueden descomponer la matriz extracelular y mejorar la propagación del virus dentro del tumor.

En una realización alternativa, la presente invención contempla la utilización de los nanotransportadores de la presente invención para el tratamiento de enfermedades asociadas con un aumento de la producción de IL-11 por células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, por monocitos CD14+. Una lista no exclusiva de enfermedades mediadas por IL-11 agudas y crónicas incluye, pero sin limitación a las mismas, pancreatitis aguda; ELA; enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia, incluyendo caquexia inducida por SIDA; asma y otras enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmunitaria; síndrome de fatiga crónica; enfermedades

asociadas a *Clostridium*, incluyendo diarrea asociada a *Clostridium*; indicaciones y estados coronarios, incluyendo insuficiencia cardiaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con septicemia) y revascularización coronaria; cáncer, tal como mieloma múltiple y leucemias mielógenas (por ejemplo, LMA y LMC) y otras leucemias, así como metástasis tumoral; diabetes (por ejemplo, diabetes insulínica); endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad de injerto contra huésped/rechazo de trasplantes; choque hemorrágico; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria del intestino; estados inflamatorios de una articulación, incluyendo artrosis, artritis psoriásica y artritis reumatoide (AR); enfermedad ocular inflamatoria, tal como puede estar asociada, por ejemplo, a trasplante de córnea; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares (por ejemplo, SDRA); esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteínas musculares, esp. en septicemia); neurotoxicidad (por ejemplo, tal como se induce mediante VIH); osteoporosis; dolor, incluyendo dolor relacionado con el cáncer; enfermedad de Parkinson; enfermedad periodontal; parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; choque septicémico; efectos secundarios de la radioterapia; enfermedad de la articulación temporomandibular; trastorno del sueño; uveítis; estados inflamatorios que resultan de distensión muscular, esguince, daño en cartílagos, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos patológicos.

En una realización alternativa, la presente invención contempla la utilización de los nanotransportadores de la presente invención para el tratamiento de enfermedades asociadas con un aumento de la producción de TNF- α por células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, por monocitos CD14+. Una lista no exclusiva de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de TNF- α incluye caquexia/anorexia; cáncer (por ejemplo, leucemias); síndrome de fatiga crónica; indicaciones y estados coronarios, incluyendo insuficiencia cardiaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con septicemia) y revascularización coronaria; depresión; diabetes, incluyendo diabetes mellitus de tipo 1, de aparición en la juventud, y resistencia a la insulina (por ejemplo, tal como la asociada a la obesidad); endometriosis, endometritis y estados relacionados; fibromialgia o analgesia; rechazo de injerto contra huésped; hiperalgesia; enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn y diarrea asociada a *Clostridium difficile*; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedades pulmonares (por ejemplo, síndrome de deficiencia respiratoria del adulto, asma y fibrosis pulmonar); esclerosis múltiple; enfermedades neuroinflamatorias; enfermedades y estados oculares, incluyendo trasplante de córnea, degeneración ocular y uveítis; dolor, incluyendo dolor relacionado con el cáncer; pancreatitis; enfermedades periodontal; pitiriasis rubra pilaris (PRP); prostatitis (bacteriana o no bacteriana) y estados relacionados; psoriasis y estados relacionados; fibrosis pulmonar; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas, incluyendo artritis reumatoide, artrosis, artritis (reumatoide) juvenil, poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis sistémica, vasculitis (por ejemplo, enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis ("septicémica") inducida por estafilococos, síndrome de Sjogren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes); choque septicémico; efectos secundarios de la radioterapia; lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedad de la articulación temporomandibular; tiroiditis; trasplante de tejido o un estado inflamatorio que resulta de distensión muscular, esguince, daño en cartílagos, traumatismo, cirugía ortopédica, infección (por ejemplo, por VIH, *Clostridium difficile* y especies relacionadas) u otros procesos patológicos.

Se apreciará que pueden tratarse enfermedades asociadas con un aumento de la producción de IL-1 o TNF- α utilizando compuestos citotóxicos con el fin de reducir el número de monocitos viables o, alternativamente, es posible seleccionar como diana específicamente IL-1 o TNF- α utilizando compuestos que pueden inhibir o reducir específicamente la síntesis de estas citocinas. Por tanto, los nanotransportadores de la presente invención pueden comprender inhibidores específicos de IL-1 y TNF- α , tales como oligonucleótidos antisentido específicos de IL-1 o TNF- α , ribozimas, ARNip, aptámeros y similares o polinucleótidos que codifican para dichos inhibidores. Se entenderá que si los nanotransportadores comprenden un polinucleótido que codifica un compuesto inhibidor, estará idealmente bajo el control de un promotor específico de monocitos tal como el promotor de CD11b.

Los usos médicos que se dan a conocer en la presente memoria descriptiva contemplan la utilización de cualquiera de los nanotransportadores mencionados anteriormente, incluyendo virus, una partícula de tipo viral, una nanopartícula o un armazón proteico que porta una proteína de fibra corta del subgrupo F de adenovirus tal como la proteína de fibra corta de Ad40 o la proteína de fibra corta de Ad41. En una realización aún más preferente, la partícula adenoviral es un Ad5 y la proteína de fibra corta es la proteína de fibra corta de Ad40.

La presente invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, parte del dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41 para inducir una respuesta inmunitaria mediante el suministro de un antígeno o parte del mismo para el tratamiento de una enfermedad asociada con células del linaje de monocitos-macrófagos, en la que el nanotransportador se selecciona del grupo de

un virus o una partícula de tipo viral y en la que dicho virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.

5 La presente invención también se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte del dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41 para reducir una respuesta inmune aumentada mediante el suministro de compuestos citotóxicos, en la que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus o una partícula de tipo viral y en la que dicho virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.

10 La presente invención también se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, parte del dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41 para reducir la inflamación mediante el suministro de un componente antiinflamatorio, en la que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus o una partícula de tipo viral y en la que el virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.

15 La presente invención se describe mediante los siguientes ejemplos que han de interpretarse como simplemente ilustrativos y no limitativos del alcance de la presente invención.

20 EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Ad5/40 recombinantes

25 Se obtuvieron Ad5/40 recombinantes sustituyendo toda la proteína de fibra de Ad5 por la fibra corta de Ad40 completa.

Amplificación de virus

30 Se hicieron crecer células HEK-293 (Q-BIOgene, Montreal, Canadá) en medio DMEM (No. E15-810, laboratorios PAA, Linz, Austria) y el 10% de suero bovino fetal (SBF) (laboratorios PAA, Linz, Austria).

35 Se amplificaron secuencialmente disoluciones madre de virus en una placa de 10 cm (10^7 células) y en veinte placas de 15 cm (5×10^8 células) durante de 36 horas (Ad5) a 60 horas (Ad5/40) o hasta que se observó efecto citopático. Las etapas de amplificación totales duraron 7-10 días para vectores de Ad5, y 30-45 días para vectores de Ad5/40.

40 En todos los casos, en la etapa de amplificación final, se concentró el sedimento celular hasta un volumen final de 40-45 ml, y se realizaron tres rondas de congelación/descongelación para liberar partículas de virus. Se centrifugó el sobrenadante en dos gradientes de CsCl consecutivos [(a) gradiente escalonado de $1,40 \text{ g/cm}^3$ - $1,25 \text{ g/cm}^3$; y (b) un gradiente isopícnico de $1,35 \text{ g/cm}^3$] para purificar partículas virales y se desalinizó utilizando una columna de desalinización PD-10 de Sephadex (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para eliminar el CsCl.

45 Se valoraron las disoluciones madre virales purificadas finales determinando su concentración (partículas/ml) mediante la densidad óptica a 260 nm (1 unidad de $\text{DO}_{260} = 1,1 \times 10^{12}$ partículas/ml), y se midió su capacidad de infección (unidades infecciosas/ml) mediante ensayo de dilución de punto final. En resumen, se realizaron ensayos de dilución de punto final por triplicado infectando 293 células con vectores diluidos en serie, y contando a continuación el número de células que expresan el transgén (GFP o βgal) tras 24 horas (Alba y otros). La proporción de partículas con respecto a unidad infecciosa de adenovirus utilizada en los experimentos tenía un promedio de 15:1 para Ad5 y de 100:1 a 500:1 para Ad5/40.

50 Se analizaron todos los vectores producidos para someter a prueba la ausencia de contaminación por bacterias, hongos, levaduras y micoplasmas.

55 Cultivo y líneas celulares

60 Se hizo crecer la línea celular de ratón de monocitos-macrófagos RAW 264.7 en DMEM (No. 41965, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 10% de FBS (No. 10106-169, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 2% de disolución de penicilina-estreptomicina (Pen/Strep) (No. 15070-063, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU). Se hicieron crecer las líneas celulares U-937 y THP-1 de monocitos humanas en RPMI 1640 (No. 21875-034, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 10% de FBS + el 2% de Pen/Strep.

Transducción de líneas celulares

65 Se hicieron crecer las líneas celulares de monocitos humanas THP-1 y U-937 en ausencia de cualquier factor de diferenciación, tal como LPS, PMA, etc., para evitar la unión de células al sustrato y la diferenciación de las células en un fenotipo de macrófago. Para el análisis de transducción de THP-1 y U-937, se recogieron células expandidas

en cultivo y se contaron las células viables utilizando el método de exclusión de azul tripano. Entonces se sembraron las células en medio de infección: DMEM + el 2% de FBS + el 1% de NEAA (No. 11140, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 2% de Pen/Strep a una densidad de 750.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después de sembrar, se añadieron al cultivo 100 µl de medio de infección o 100 µl de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5/40 o 100 µl de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector Ad5.

Para la transducción de la línea celular RAW 264.7 adherente de ratón, se separaron las células expandidas en cultivo del sustrato utilizando un rascador de células y se contaron las células viables tal como se describió anteriormente. Entonces se sembraron las células en medio de crecimiento a una densidad de 750.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se dejó que se unieran durante 24 horas. Tras la unión de las células, se sustituyó el medio de crecimiento por medio de infección y se añadieron al cultivo 100 µl de medio de infección o 100µl de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5/40 o 100µl de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5.

A continuación, las placas se agitaron suavemente para distribuir uniformemente el vector adenoviral en el cultivo. Se incubaron todas las placas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se monitorizó la expresión de GFP cada 24 horas en un microscopio de fluorescencia invertido.

Análisis de citometría de flujo de las líneas celulares

Dos días tras la transducción, se recogieron las células sobrenadantes de THP-1 y U-937 y se colocaron en tubos de centrífuga de 1,5 ml. Entonces se centrifugaron las células a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se lavaron las células con 1 ml de 1 X PBS y se centrifugaron los tubos de nuevo a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró con cuidado la fracción de sobrenadante y se suspendió el sedimento celular en 300 µl de 1 X PBS + el 2% de formaldehído.

Se recogieron las células de la línea celular adherente RAW 264.7 raspando las células dos días tras la transducción y se procesaron tal como se describió anteriormente para THP-1 y U-937.

Se analizaron las líneas celulares mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACSCANTO II (RAW 264.7 y U-937) y un citómetro de flujo BD FACSCalibur (THP-1)

Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas

Se centrifugaron cuarenta y cinco ml de sangre obtenida de capas leucocitarias de donantes humanos sanos a 300 X g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la fracción de plasma y se reestableció el volumen total mediante la adición de 1 X PBS + el 0,5% de FBS. Se repitió esta etapa de lavado una vez más. Tras terminar las etapas de lavado, se diluyó la sangre 1:1 con 1 X PBS + el 0,5% de FBS. Se colocaron treinta mililitros de sangre diluida sobre 15 ml de Lymphoprep (No. 1114544, AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Noruega) en un tubo de centrífuga de 50 ml. Entonces se centrifugó la sangre a 800 X g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se fijaron los tubos en un soporte metálico y se retiró cuidadosamente la capa de PBMC utilizando una punta de filtro de 1,250 ml estéril extra-larga sujeta a una pipeta de 1 ml. Se colocaron las PBMC recuperadas en un tubo de centrífuga de 50 ml y se diluyeron con 1 X PBS hasta un volumen final de 45 ml. Entonces se invirtieron los tubos para lavar las células. Entonces se centrifugaron las PBMC diluidas a 400 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se desechó la fracción de sobrenadante sin perturbar el sedimento celular. Se repitió una vez más esta etapa de lavado, pero esta vez se dejó en el tubo un volumen de 2-3 ml de la fracción de sobrenadante. Se suspendieron las PBMC en este volumen y se diluyeron 20 µl de la suspensión celular 1:10 en 1 X PBS. Se diluyeron adicionalmente diez microlitros de esta dilución 1:1 con el colorante azul tripano (No. T8154, SIGMA, Múnich, Alemania). Se contaron las células viables en un hemocitómetro Neubauer bajo un microscopio invertido utilizando un filtro de contraste de fases (x 100). Se contaron las células viables de cuatro cuadrados diferentes de 1 mm cuadrado de área y se calculó la media aritmética. Se utilizó esta media para calcular la concentración celular (células/ml) en la disolución de PBMC y a continuación se diluyeron las células en medio de infección: DMEM + el 2% de FBS + el 1% de NEAA + el 2% de Pen/Strep hasta obtener una concentración final de 1.034.483 células/ml. Tras la dilución, se contaron las células de nuevo tal como se indicó anteriormente para determinar que la concentración celular se encontraba entre un intervalo de desde 1.006.897 hasta 1.062.069 células/ml. Se sembraron setecientos cincuenta microlitros de la suspensión de PBMC por pocillo (750.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos.

Anticuerpos

Para el análisis de citotoxicidad se utilizaron anticuerpos contra células de monocito humanas: anticuerpo anti-CD14-APC (No. 345787, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) para la determinación de células CD14+ junto con el colorante reactivo violeta-fluorescente (No. L34955, Invitrogen Ltd, Paisley, RU) para la discriminación de células viables y no viables.

Para el análisis de especificidad de transducción se utilizó una disolución mixta de anticuerpos contra células humanas que contenía: anticuerpo anti-CD3-PerCP (No. 345766, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), anticuerpo anti-CD16-PE (Leu-11c) (No. 332779, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), anticuerpo anti-CD19-APC-Cy7 (No. 348814, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), anticuerpo anti-CD56-PE (No. 345810, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) y anticuerpo anti-CD14-APC (No. 345787, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

Análisis de citotoxicidad

Se sembraron setecientos cincuenta microlitros de PBMC por pocillo (750.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después de sembrar, se añadieron al cultivo 100µl de medio de infección o 100µl de medio de infección que contenía diferentes cantidades de partículas físicas del vector de Ad5/40 o 100µl de medio de infección que contenía diferentes cantidades de partículas físicas del vector de Ad5. Se agitaron suavemente las placas para distribuir uniformemente el vector adenoviral en el cultivo. Se incubaron todas las placas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se monitorizó la expresión de GFP cada 24 horas en un microscopio de fluorescencia invertido.

Análisis de especificidad de transducción

Se sembraron setecientos cincuenta microlitros de PBMC por pocillo (750.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después de sembrar, se añadieron al cultivo de PBMC 100µl de medio de infección o 100µl de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5/40 o 100µl de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5. Se agitaron suavemente las placas para distribuir uniformemente el vector adenoviral en el cultivo. Se incubaron todas las placas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se monitorizó la expresión de GFP cada 24 horas en un microscopio de fluorescencia invertido.

Análisis de citometría de flujo de PBMC

Dos días tras la transducción, se recogieron las PBMC sobrenadantes y se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 ml. Entonces se centrifugaron las células a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retiró con cuidado el sobrenadante y se suspendió el sedimento celular en 100µl de una disolución de 1 X PBS que contenía los anticuerpos correspondientes. Entonces se incubaron los tubos que contenían las PBMC suspendidas en esta disolución durante 15-20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadió 1 ml de 1 X PBS a cada tubo y se centrifugaron los tubos a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retiró con cuidado el sobrenadante y se suspendió el sedimento celular en 300µl de 1 X PBS + el 2% de formaldehído. Entonces se analizaron las poblaciones celulares en un citómetro de flujo BD FACSCANTO II.

EJEMPLO 1

Ad5/40 puede transfectar macrófagos de ratón de la mucosa intestinal

Se administraron Ad5/40-GFP recombinantes por vía oral y por vía intrarrectal a ratones. Se observó fluorescencia verde al nivel de la submucosa en secciones de tejido intestinal. Puesto que la presencia de macrófagos residentes en esta zona es común incluso en animales sanos, se decidió evaluar si Ad5/40 podía transfectar de manera eficaz líneas celulares de macrófagos de ratón. Se cultivaron células de RAW 264.7 y se infectaron con Ad5/40-GFP a 250 partículas físicas/célula (figura 1). De manera interesante, la eficacia de infección era claramente mayor que la de Ad5 en las mismas condiciones. Por tanto, los resultados confirmaron que Ad5/40 podía transfectar de manera eficaz macrófagos de ratón.

EJEMPLO 2

Ad5/40 puede transfectar macrófagos derivados de monocitos humanos

A continuación se sometió a prueba la capacidad de Ad5/40 para transfectar de manera eficaz macrófagos derivados de monocitos humanos. Para este fin, se cultivaron células THP1 (buena efectividad utilizando Ad5) y U-937 (capacidad de infección muy baja utilizando Ad5) en ausencia de cualquier factor de diferenciación que pudiera inducir la maduración de monocitos en macrófagos (tal como LPS, PMA, etc.). En esta fase, se cambió el medio de cultivo a medio de infección y se añadieron 250 partículas físicas/célula de Ad5/40-GFP o 250 partículas físicas/célula de Ad5-GFP. El análisis de citometría de flujo de la fracción de sobrenadante de los diferentes cultivos reveló un mayor porcentaje de células transducidas y una mayor expresión de GFP en los cultivos infectados por el vector de Ad5/40 tras 48 horas, confirmando así la eficacia superior de este vector en la transfección de líneas celulares de monocitos humanas (figura 2).

EJEMPLO 3

Ad5/40 puede transfectar monocitos de sangre periférica

5 A continuación, se sometió a prueba si Ad5/40 podía transfectar monocitos de sangre periférica. Para este fin, se obtuvieron células mononucleares (es decir, linfocitos, monocitos y células NK) obtenidas a partir de capas leucocitarias de sangre de donante humano sano. De manera interesante, el Ad5/40 pudo infectar selectivamente monocitos de sangre periférica, a pesar del hecho de que representan en promedio sólo el 8% de las células sanguíneas mononucleares totales (figura 3). De hecho, a una dosis de 250 partículas físicas por célula, la infección no es sólo más eficaz en el caso de Ad5/40 en comparación con Ad5 (el 66% frente al 15%) (figura 4), sino que también era extremadamente selectiva ya que más del Ad5/40 infectó exclusivamente el 99,9% de las células CD14+ (monocitos).

EJEMPLO 4

15 La transducción de monocitos mediante Ad5/40 depende exclusivamente de CD14 y no de CD16

Con el fin de caracterizar mejor las diferencias en la capacidad de infección entre Ad5 y Ad5/40, se utilizaron condiciones de carga viral de no saturación (250 partículas virales por célula sanguínea). Sin embargo, en estas condiciones es posible determinar si cualquiera de las subpoblaciones de monocitos, tales como CD14+/CD16+ proinflamatorios frente a CD14+/CD16- clásicos está infectada selectivamente. Tal como se muestra en la figura 5, la capacidad de infección de Ad5/40 no está asociada con la expresión de CD16: Ad5 ($15 \pm 2\%$ frente al $17\% \pm 3$); Ad5/40 ($67\% \pm 3$ frente al $66\% \pm 2$). Éste es un punto importante porque ambas poblaciones CD14+/CD16 tienen importantes aplicaciones terapéuticas y, por tanto, la capacidad de Ad5/40 para infectar eficazmente los dos subconjuntos de monocitos de sangre periférica implica un gran potencial de Ad5/40 como herramienta para la transferencia génica específica de célula.

Un análisis más detallado de la capacidad de infección de Ad5/40 en células CD14+/CD16- y CD14+/CD16+ muestra que el nivel de expresión transgénica por célula infectada es significativamente superior (aproximadamente el 200%) para Ad5/40 que para el Ad5 (figura 6), lo que junto con los porcentajes de células infectadas significa que la cantidad de proteína expresada es aproximadamente 10 veces superior para Ad5/40 que para el Ad5 (figura 7). En ambos casos, la expresión de GFP es ligeramente superior en monocitos (CD14+/CD16+), aunque no hay diferencias significativas en comparación con monocitos (CD14+/CD16-) clásicos.

EJEMPLO 5

La transducción de células CD14+ mediante Ad5/40 no da como resultado una pérdida significativa de viabilidad celular

40 Para someter a prueba la citotoxicidad relativa de Ad5/40 frente a Ad5, se realizó un experimento de dosis-respuesta. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica humana con dosis virales crecientes. Tal como se muestra en la figura 8, en todas las condiciones sometidas a prueba, Ad5/40 es claramente más eficaz en la infección de células CD14+ que Ad5. Por tanto, la capacidad de infección de Ad5/40 forma una meseta cuando casi el 90% de los monocitos totales se infectan, mientras que para Ad5, no se observa saturación incluso a dosis muy altas (2500 partículas físicas por célula). El análisis de las dos curvas de dosis-respuesta muestra que Ad5/40 es aproximadamente 25-50 veces más eficaz para la transferencia génica a células CD14+ que Ad5, puesto que para infectar un 33% de monocitos se necesita una dosis de 2500 partículas de Ad5 por célula, mientras que son suficientes dosis de 50-100 partículas de Ad5/40 por célula para igualar este nivel de infección. La dosis de Ad5/40 utilizada en la mayoría de los experimentos (250 partículas por célula) está justo por debajo de la fase de saturación o meseta.

La baja eficacia de Ad5 para infectar células CD14+ podría explicar por qué en las condiciones más altas utilizadas (2500 partículas por célula) la viabilidad de células CD14+ apenas se ve afectada. Por el contrario, Ad5/40 a dosis altas (1000 y 2500 partículas virales por célula) está asociado con una disminución en la viabilidad de células CD14+, probablemente debido a la citotoxicidad provocada por la alta carga viral (figura 9).

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
GRIFOLS S.A.
FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT
GERMANS TRIAS I PUJOL
FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS
65 AVANÇATS

<120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA UNA TRANSFERENCIA GÉNICA EFICAZ Y DIRIGIDA A CÉLULAS DEL LINAJE DE MONOCITOS MACRÓFAGOS

5 <130> P4401PC00

<150> EP09159001.8

<151> 2009-04-29

10 <160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

15 <211> 387

<212> PRT

<213> Subgrupo F adenovirus 40

<400> 1

20

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

25

Asp Thr Ser Ser Thr Pro Ser Ile Pro Tyr Val Ala Pro Pro Phe Val
20 25 30

30

Ser Ser Asp Gly Leu Gln Glu Asn Pro Pro Gly Val Leu Ala Leu Lys
35 40 45

35

Tyr Thr Asp Pro Ile Thr Thr Asn Ala Lys His Glu Leu Thr Leu Lys
50 55 60

Leu Gly Ser Asn Ile Thr Leu Gln Asn Gly Leu Leu Ser Ala Thr Val
65 70 75 80

40

Pro Thr Val Ser Pro Pro Leu Thr Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Leu
85 90 95

45

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

50

Thr Ala Ala Pro Leu Thr Val Ser Asn Asn Gln Leu Ser Ile Asn Thr
115 120 125

55

Gly Arg Gly Leu Val Ile Thr Asn Asn Ala Val Ala Val Asn Pro Thr
130 135 140

Gly Ala Leu Gly Phe Asn Asn Thr Gly Ala Leu Gln Leu Asn Ala Ala
145 150 155 160

60

Gly Gly Met Arg Val Asp Gly Ala Asn Leu Ile Leu His Val Ala Tyr
165 170 175

65

Pro Phe Glu Ala Ile Asn Gln Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asn Gly Leu
180 185 190

ES 2 550 834 T3

5 Glu Val Thr Asn Gly Gly Lys Leu Asn Val Lys Leu Gly Ser Gly Leu
 195 200 205

10 Gln Phe Asp Asn Asn Gly Arg Ile Thr Ile Ser Asn Arg Ile Gln Thr
 210 215 220

15 Arg Gly Val Thr Ser Leu Thr Thr Ile Trp Ser Ile Ser Pro Thr Pro
 225 230 235 240

20 Asn Cys Ser Ile Tyr Glu Thr Gln Asp Ala Asn Leu Phe Leu Cys Leu
 245 250 255

25 Thr Lys Asn Gly Ala His Val Leu Gly Thr Ile Thr Ile Lys Gly Leu
 260 265 270

30 Lys Gly Ala Leu Arg Glu Met Asn Asp Asn Ala Leu Ser Val Lys Leu
 275 280 285

35 Pro Phe Asp Asn Gln Gly Asn Leu Leu Asn Cys Ala Leu Glu Ser Ser
 290 295 300

40 Thr Trp Arg Tyr Gln Glu Thr Asn Ala Val Ala Ser Asn Ala Leu Thr
 305 310 315 320

45 Phe Met Pro Asn Ser Thr Val Tyr Pro Arg Asn Lys Thr Ala Asp Pro
 325 330 335

50 Gly Asn Met Leu Ile Gln Ile Ser Pro Asn Ile Thr Phe Ser Val Val
 340 345 350

55 Tyr Asn Glu Ile Asn Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Phe Lys Trp Ser Ala
 355 360 365

60 Glu Pro Gly Lys Pro Phe His Pro Pro Thr Ala Val Phe Cys Tyr Ile
 370 375 380

65 Thr Glu Gln
 385

70 <210> 2
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Subgrupo F Adenovirus 41

75 <400> 2

80 Met Lys Arg Thr Arg Ile Glu Asp Asp Phe Asn Pro Val Tyr Pro Tyr
 1 5 10 15

85 Asp Thr Phe Ser Thr Pro Ser Ile Pro Tyr Val Ala Pro Pro Phe Val

ES 2 550 834 T3

20 25 30
 5 Ser Ser Asp Gly Leu Gln Glu Lys Pro Pro Gly Val Leu Ala Leu Lys
 35 40 45
 Tyr Thr Asp Pro Ile Thr Thr Asn Ala Lys His Glu Leu Thr Leu Lys
 10 50 55 60
 Leu Gly Ser Asn Ile Thr Leu Glu Asn Gly Leu Leu Ser Ala Thr Val
 15 65 70 75 80
 Pro Thr Val Ser Pro Pro Leu Thr Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Leu
 85 90 95
 20 Ala Thr Ser Ala Pro Ile Ala Val Ser Ala Asn Ser Leu Thr Leu Ala
 100 105 110
 Thr Ala Ala Pro Leu Thr Val Ser Asn Asn Gln Leu Ser Ile Asn Ala
 25 115 120 125
 Gly Arg Gly Leu Val Ile Thr Asn Asn Ala Leu Thr Val Asn Pro Thr
 30 130 135 140
 Gly Ala Leu Gly Phe Asn Asn Thr Gly Ala Leu Gln Leu Asn Ala Ala
 35 145 150 155 160
 Gly Gly Met Arg Val Asp Gly Ala Asn Leu Ile Leu His Val Ala Tyr
 165 170 175
 40 Pro Phe Glu Ala Ile Asn Gln Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asn Gly Leu
 180 185 190
 Glu Val Thr Ser Gly Gly Lys Leu Asn Val Lys Leu Gly Ser Gly Leu
 45 195 200 205
 Gln Phe Asp Ser Asn Gly Arg Ile Ala Ile Ser Asn Ser Asn Arg Thr
 50 210 215 220
 Arg Ser Val Pro Ser Leu Thr Thr Ile Trp Ser Ile Ser Pro Thr Pro
 225 230 235 240
 55 Asn Cys Ser Ile Tyr Glu Thr Gln Asp Ala Asn Leu Phe Leu Cys Leu
 245 250 255
 60 Thr Lys Asn Gly Ala His Val Leu Gly Thr Ile Thr Ile Lys Gly Leu
 260 265 270
 65 Lys Gly Ala Leu Arg Glu Met His Asp Asn Ala Leu Ser Leu Lys Leu
 275 280 285

ES 2 550 834 T3

Pro Phe Asp Asn Gln Gly Asn Leu Leu Asn Cys Ala Leu Glu Ser Ser
290 295 300

5

Thr Trp Arg Tyr Gln Glu Thr Asn Ala Val Ala Ser Asn Ala Leu Thr
305 310 315 320

10

Phe Met Pro Asn Ser Thr Val Tyr Pro Arg Asn Lys Thr Ala His Pro
325 330 335

15

Gly Asn Met Leu Ile Gln Ile Ser Pro Asn Ile Thr Phe Ser Val Val
340 345 350

20

Tyr Asn Glu Ile Asn Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Phe Lys Trp Ser Ala
355 360 365

Glu Pro Gly Lys Pro Phe His Pro Pro Thr Ala Val Phe Cys Tyr Ile
370 375 380

25

Thr Glu Gln
385

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para suministrar un compuesto de interés a células CD14+ derivadas de monoblastos que comprende poner en contacto dichas células con un nanotransportador que porta dicho compuesto de interés, en el que el nanotransportador comprende, como mínimo, el dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41, en el que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus o una partícula de tipo viral y en el que dicho virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, en el que el nanotransportador es una partícula adenoviral, preferentemente un Ad5.
- 15 3. Método, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el compuesto de interés se suministra a una célula del linaje de monocitos-macrófagos seleccionada de una célula sanguínea mononuclear primaria o una célula dendrítica derivada de monocito.
- 20 4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de interés se selecciona del grupo que comprende agentes terapéuticos, agentes para el diagnóstico, agentes profilácticos, y/o agentes nutracéuticos.
- 25 5. Método, según la reivindicación 4, en el que el producto de interés a ser suministrado es una molécula pequeña, un ácido nucleico, tal como agentes de ADNc, ARNip, ARNi, y microARN o ARNh, ribozimas, plásmidos de ADN, aptámeros, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos aleatorizados naturales o no naturales; una proteína, un péptido, un lípido, un hidrato de carbono, una hormona, un metal, un elemento radiactivo y un compuesto, un fármaco, una vacuna, un agente inmunológico y/o combinaciones de los mismos.
- 30 6. Nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, una parte del dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41 para inducir una respuesta inmunitaria mediante el suministro de un antígeno, en el que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus o partícula de tipo viral y en el que dicho virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.
- 35 7. Nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, parte del dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41 para reducir una respuesta inmune aumentada mediante el suministro de compuestos citotóxicos, en el que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus o partícula de tipo viral y en el que dicho virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.
- 40 8. Nanotransportador que comprende un producto de interés y, como mínimo, parte del dominio knob de la proteína de fibra corta del adenovirus Ad40 o Ad41 para reducir la inflamación mediante el suministro de un componente antiinflamatorio, en el que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus o una partícula de tipo viral y en el que dicho virus o partícula de tipo viral no es un subgrupo F de adenovirus del mismo tipo que la proteína de fibra corta.

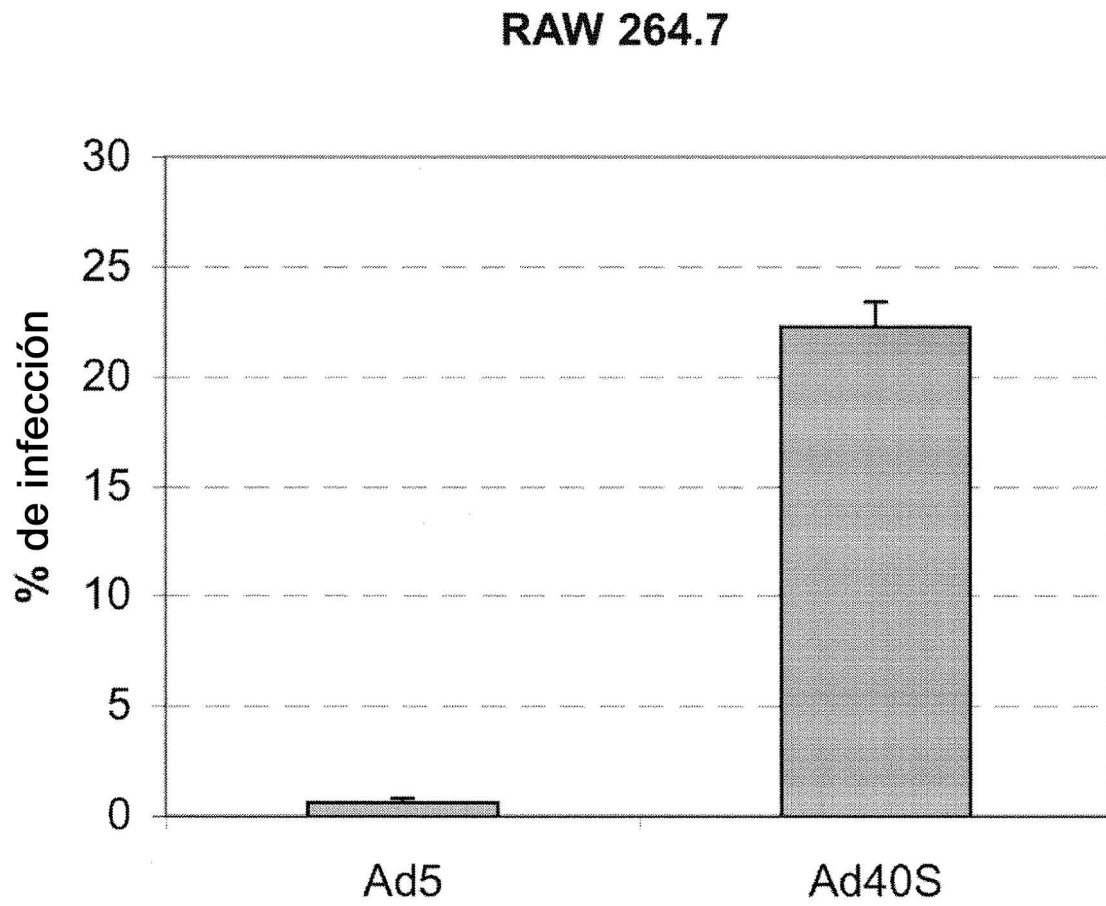


FIGURA 1

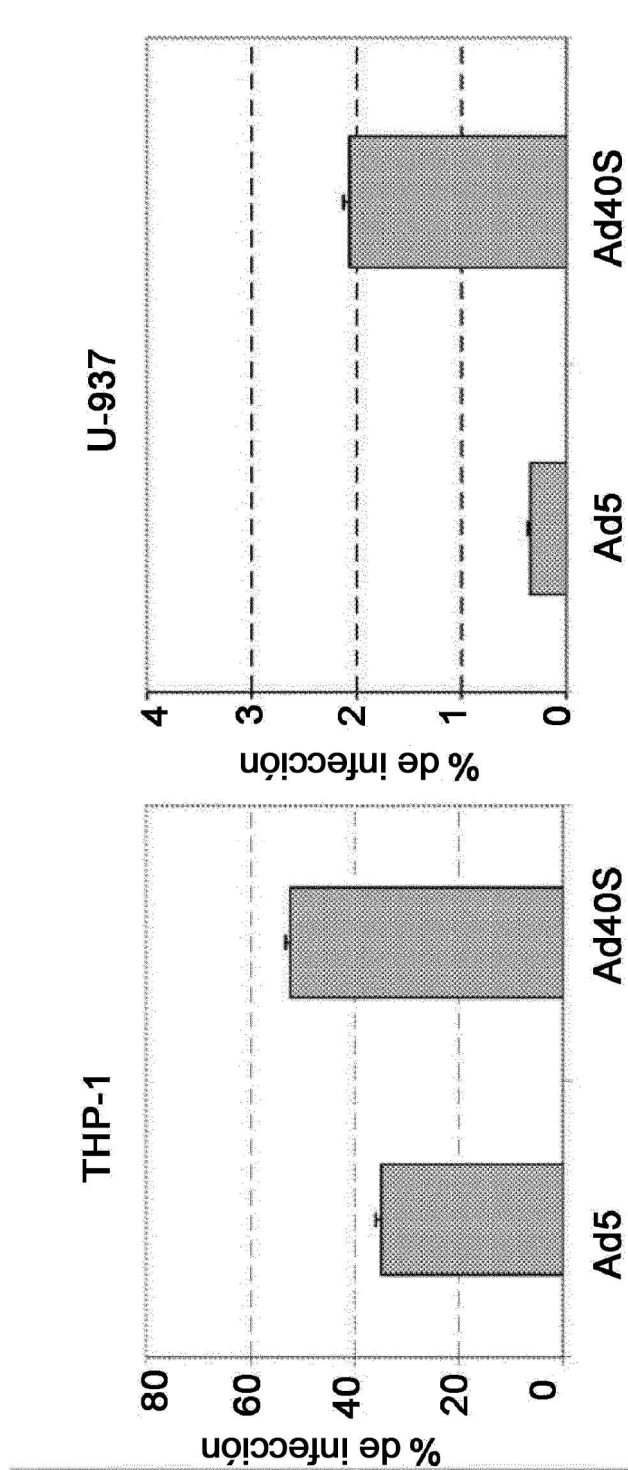


FIGURA 2

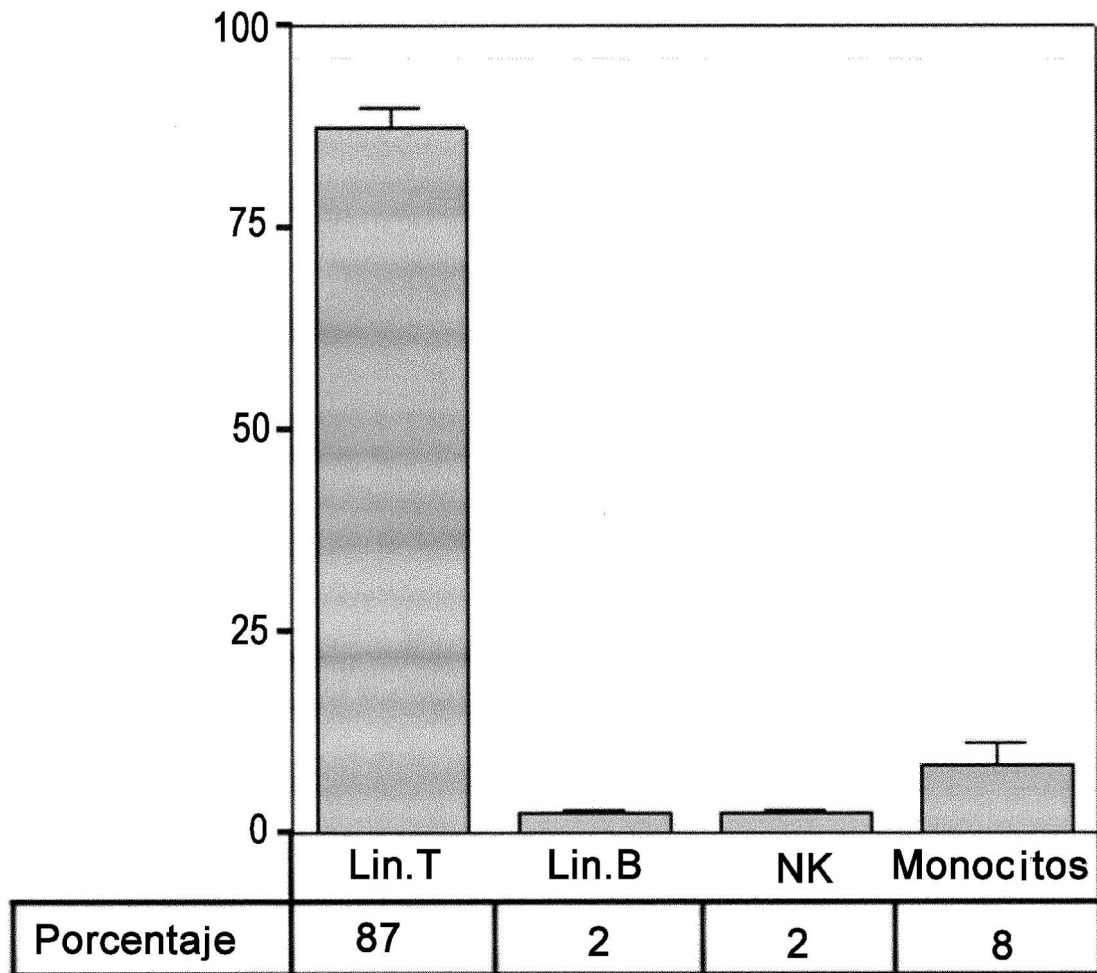


FIGURA 3

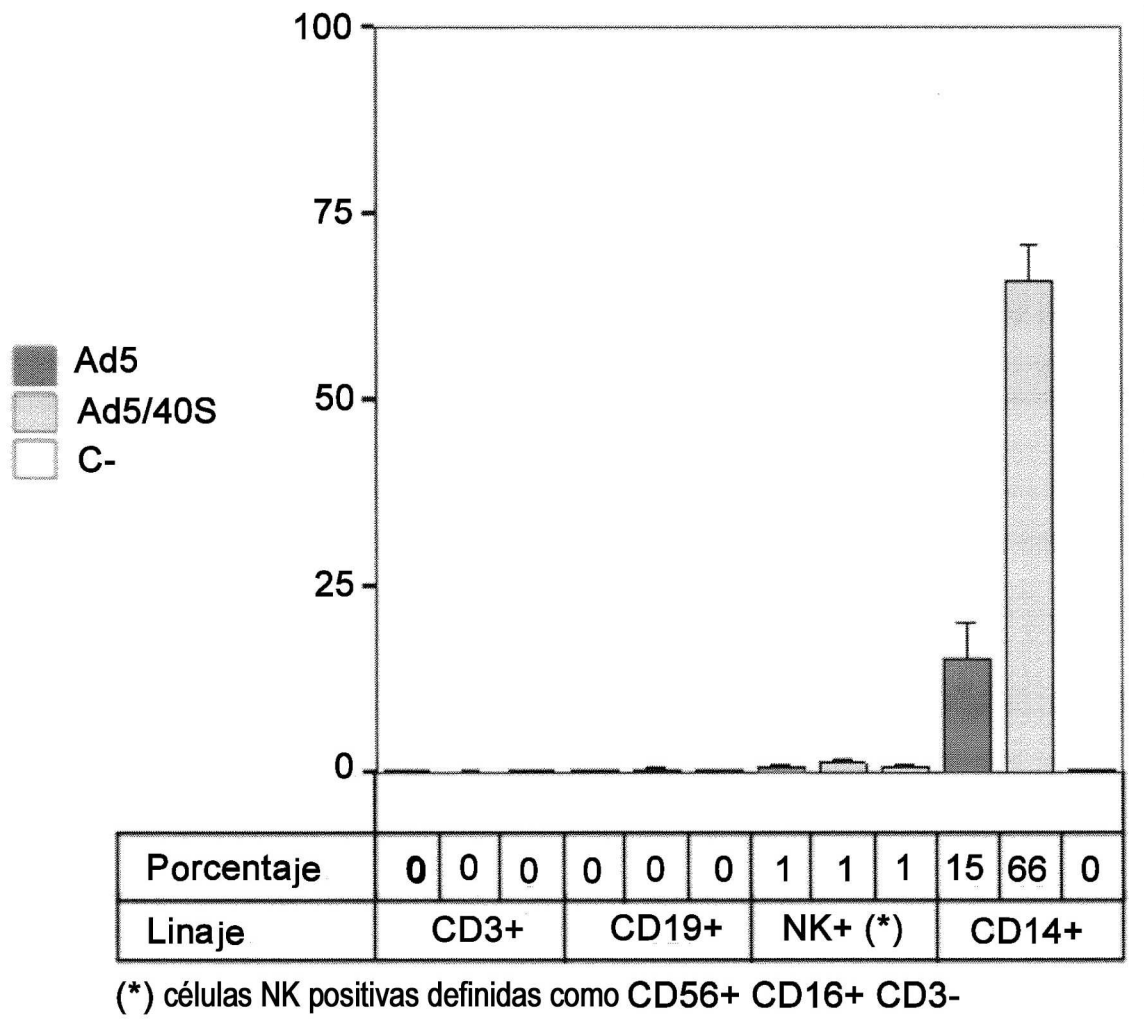


FIGURA 4

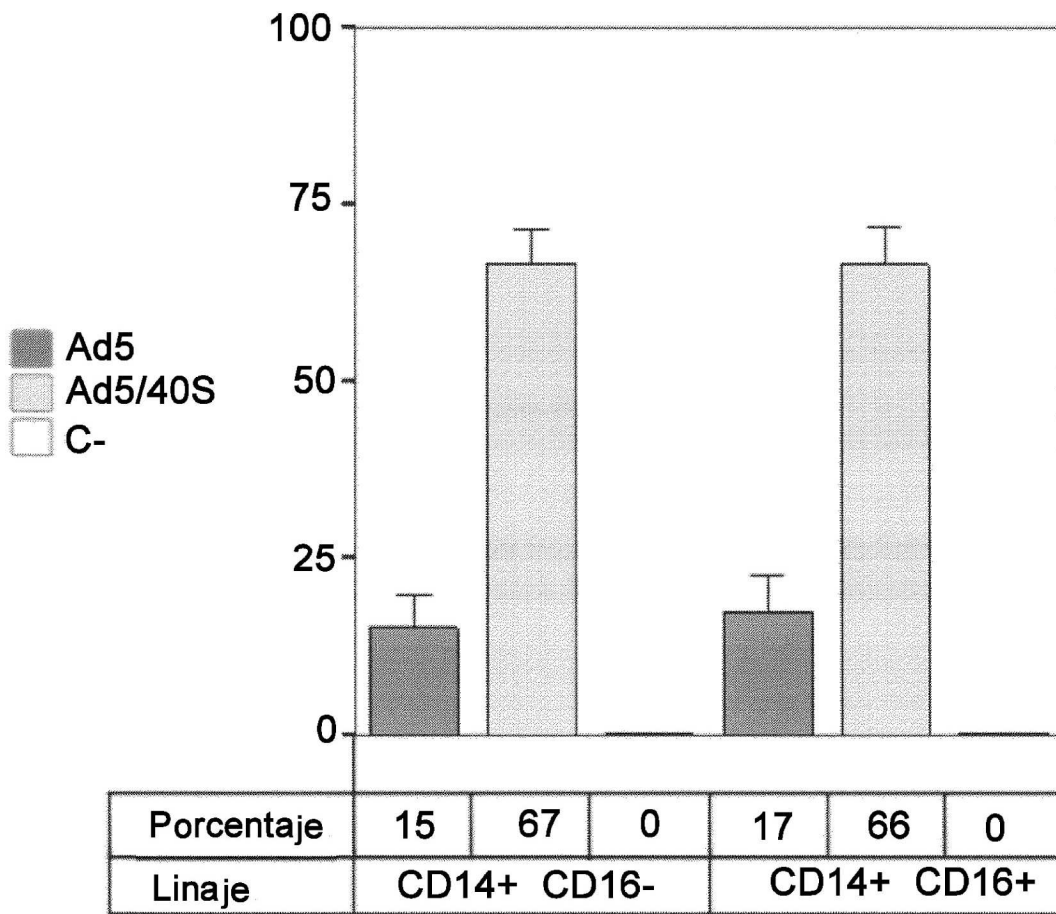


FIGURA 5

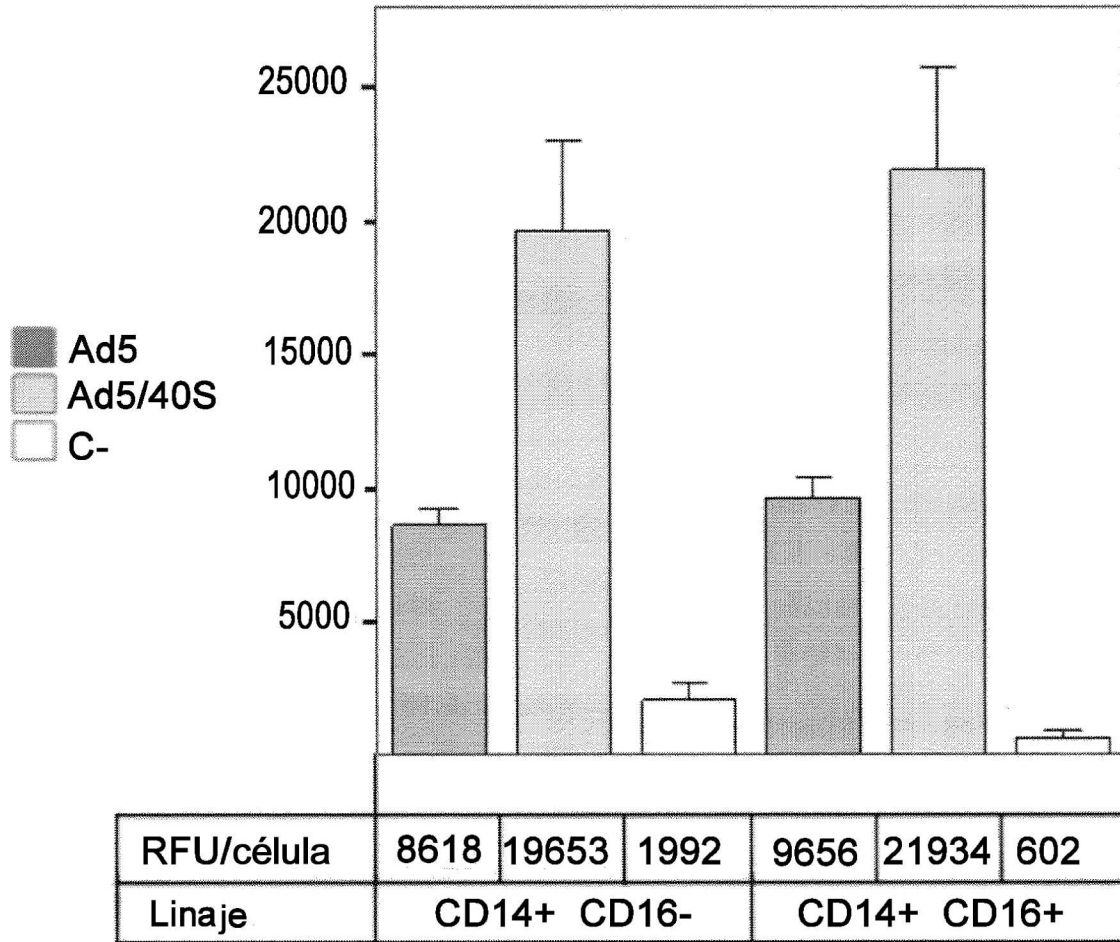


FIGURA 6

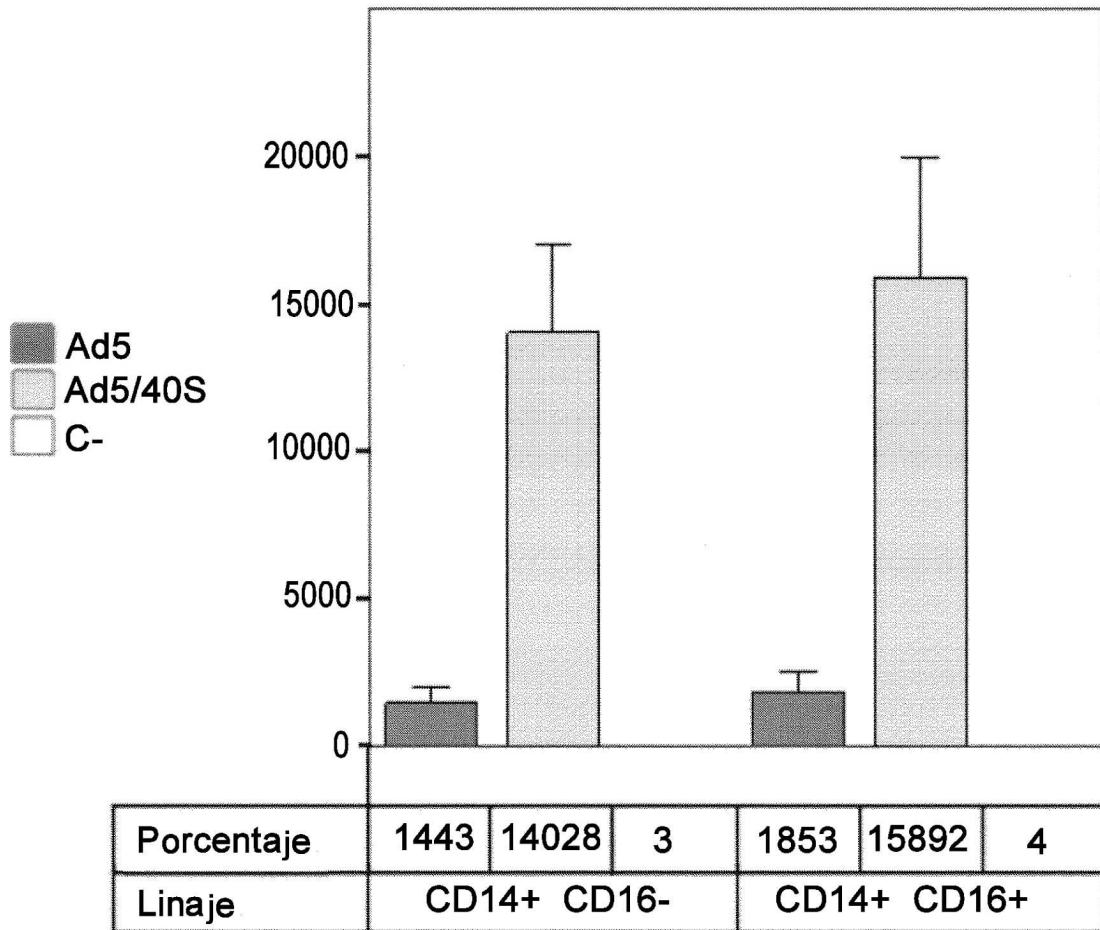


FIGURA 7

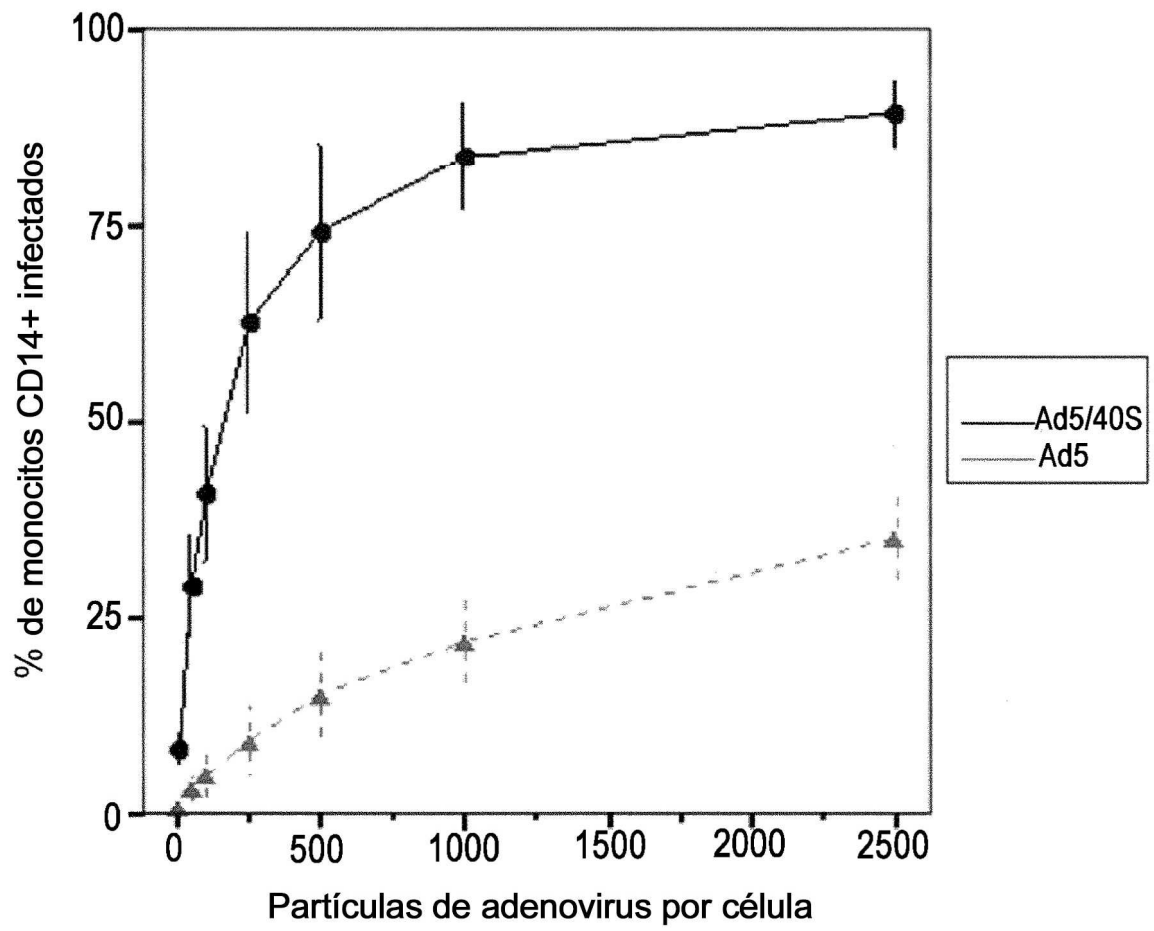


FIGURA 8

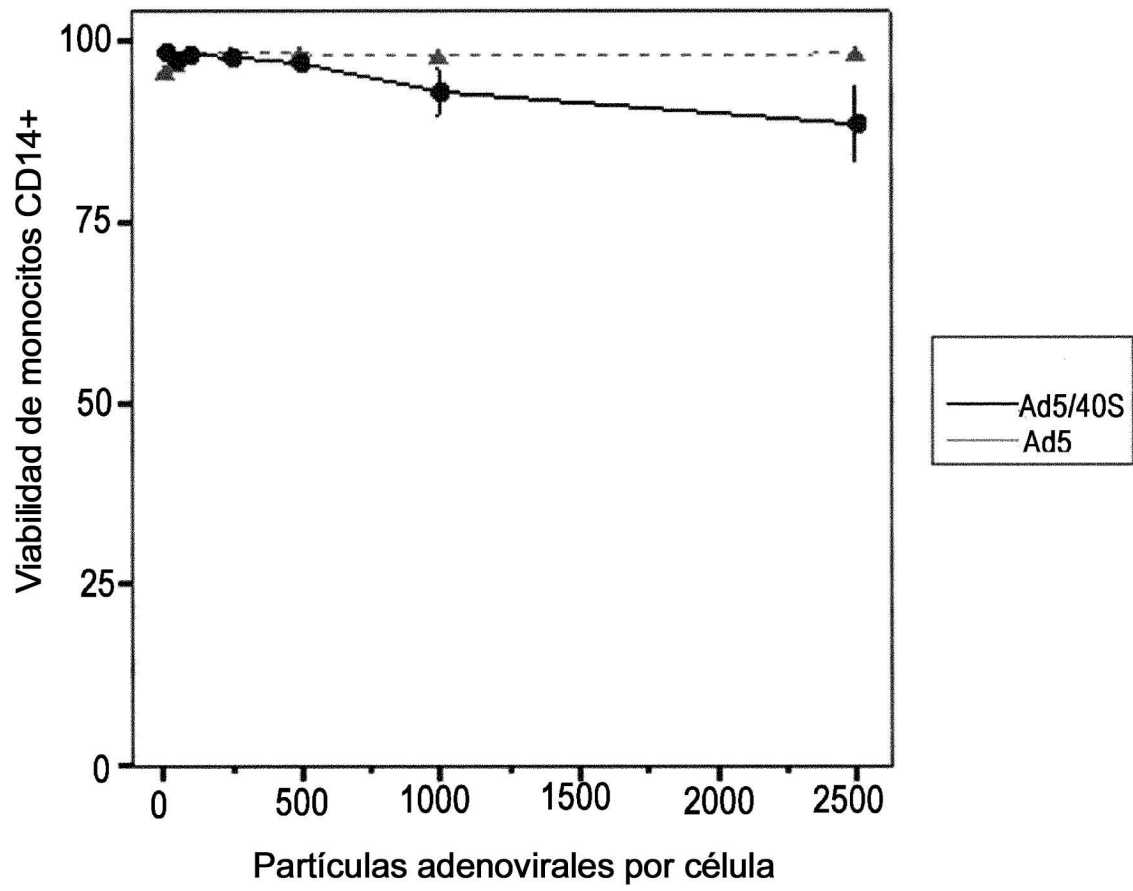


FIGURA 9

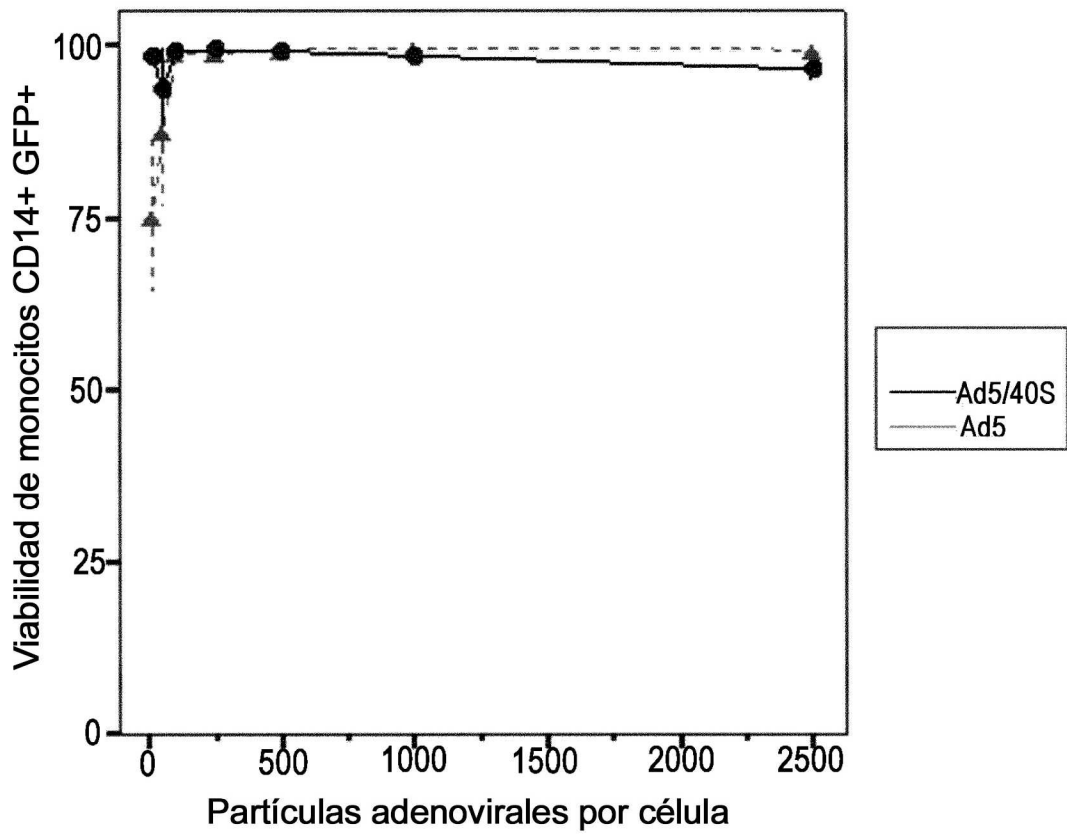


FIGURA 10