

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 029**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)
C07K 14/075 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2008 PCT/US2008/013066**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09073104**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008 E 08857159 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2220241**

54 Título: **Adenovirus que comprende una proteína hexónica de la cápside del adenovirus E de simio SA_DV-39 y usos de la misma**

30 Prioridad:

28.11.2007 US 4461 P
28.11.2007 US 4532 P
28.11.2007 US 4507 P
28.11.2007 US 4541 P
28.11.2007 US 4499 P
28.11.2007 US 4464 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.03.2017

73 Titular/es:

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PA 19104, US

72 Inventor/es:

ROY, SOUMITRA;
WILSON, JAMES, M. y
VANDENBERGHE, LUC, H.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 607 029 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

Adenovirus que comprende una proteína hexónica de la cápside del adenovirus E de simio SAdV-39 y usos de la misma

Antecedentes de la invención

5 El adenovirus es un virus de ADN bicatenario con un tamaño de genoma de aproximadamente 36 kilobases (kb), que se ha usado ampliamente para aplicaciones de transferencia génica debido a su capacidad para alcanzar una transferencia génica altamente eficiente en diversos tejidos diana y gran capacidad de transgenes. Convencionalmente, los genes E1 del adenovirus se eliminan y sustituyen con un casete de transgén que consiste en el promotor de elección, la secuencia de ADNc del gen de interés y una señal de poli A, que tiene como resultado un virus recombinante con replicación defectuosa.

10 Los adenovirus tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica que consiste en tres proteínas principales, hexón (II), base pentón (III) y una fibra nodosa (IV), junto con una serie de otras proteínas minoritarias VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 [W.C. Russell, J. Gen Virol., 81:2573-3704 (Nov 2000)] El genoma del virus es un ADN bicatenario lineal con una proteína terminal unida covalentemente al extremo 5' que tiene repeticiones terminales invertidas (ITR). El ADN del virus está asociado íntimamente con la proteína VIII altamente básica y un pequeño péptido pX (antes denominado mu). Otra proteína, V, está empaquetada con este complejo de ADN-proteína y proporciona un enlace estructural con la cápside a través de la proteína VI. El virus contiene también una proteasa codificada por el virus, que es necesaria para el procesamiento de algunas de las proteínas estructurales para producir virus infecciosos maduros.

20 Se ha desarrollado un esquema de clasificación para la familia Mastadenovirus, que incluye adenovirus humanos, simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y de zarigüeya. Este esquema de clasificación se desarrolló en base a las diferentes capacidades de las secuencias de adenovirus en la familia para aglutinar los glóbulos rojos de la sangre. El resultado fue seis subgrupos, ahora conocidos como subgrupos A, B, C, D, E y F. Véase, T. Shenk y col., Adenoviridae: The Viruses and their Replication", Cap. 67, en FIELD'S VIROLOGY, 6ª Ed., editado por B.N Fields y col., (Lippincott Raven Publishers, Philadelphia, 1996), pág. 111-2112.

25 Se han descrito adenovirus recombinantes para la liberación de moléculas heterólogas a las células huésped. Véase la patente de Estados Unidos 6.083.716, que describe el genoma de dos adenovirus de chimpancé. Los adenovirus de simio, C5, C6 y C7, se han descrito en la patente de Estados Unidos N° 7.247.472 como útiles como vectores de vacuna. Otros adenovirus de chimpancé se describen en el documento WO 2005/1071093 como útiles para la fabricación de vehículos de vacunas de adenovirus.

30 Lo que se necesita en la técnica son vectores que liberen de forma eficaz moléculas en una diana y que reduzcan al mínimo el efecto de la inmunidad preexistente a serotipos de adenovirus seleccionados en la población.

Sumario de la invención

35 En el presente documento se proporcionan secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos aisladas de cinco adenovirus de simio de la subfamilia E y vectores que contienen esas secuencias. También se proporciona una serie de procedimientos para el uso de los vectores y las células divulgados en el presente documento. Entre estos adenovirus se incluyen SAdV-39, SAdV-25.2, SAdV-26, SAdV-30, SAdV-37 y SAdV-38.

40 Los procedimientos descritos en el presente documento implican la liberación de uno o más genes heterólogos seleccionados a un paciente mamífero mediante la administración de un vector de la invención. El uso de las composiciones descritas en el presente documento para la vacunación permite la presentación de un antígeno seleccionado para el desencadenamiento de respuestas inmunitarias protectoras. Los vectores basados en estos adenovirus de simio también se pueden usar para la producción de productos de genes heterólogos *in vitro*. Tales productos génicos son ellos mismos útiles para diversos propósitos tales como se describen en el presente documento.

45 Estos y otras realizaciones y ventajas la invención se describe con más detalle más adelante.

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se divulgan secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de los adenovirus de simio 39, SAdV-25.2, SAdV-26, SAdV-30, SAdV-37 y SAdV-38, todas ellas aisladas de heces de chimpancé.

50 En un aspecto, la invención proporciona un adenovirus que tiene una cápside que comprende una proteína hexónica de la cápside de SAdV-39, los aminoácidos 1 a 940 de la SEQ ID NO: 11, encapsidando dicha cápside una molécula heteróloga portadora de un gen unido operativamente a secuencias de control de la expresión que dirigen la transcripción, la traducción y / o la expresión de las mismas en una célula huésped y elementos cis de adenovirus en 5' y 3' necesarios para la replicación y encapsidación.

En otro aspecto, la invención proporciona un adenovirus recombinante que tiene una cápside que comprende un

- exón que contiene un fragmento de una proteína hexónica de adenovirus de simio y una secuencia de ácido nucleico heteróloga del SAdV, en la que el fragmento de la proteína hexónica de SAdV es la proteína hexónica de SAdV de SEQ ID NO:11 con un truncamiento en N-terminal o en C-terminal de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud o se selecciona del grupo que consiste: los restos de aminoácidos 125 a 443 de la SEQ ID NO: 11; y restos de aminoácidos 138 a 441 de SEQ ID NO:11, en la que dicho adenovirus recombinante comprende elementos cis de adenovirus en 5' y 3' necesarios para la replicación y encapsidación, comprendiendo dichos elementos cis una repetición terminal invertida en 5' del adenovirus y una repetición terminal invertida en 3' del adenovirus, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto unida operativamente a las secuencias que dirigen la expresión de dicho producto en una célula huésped.
- 5
- 10 También se proporcionan nuevos vectores de adenovirus y líneas celulares de empaquetamiento para producir vectores basados en dichas secuencias para su uso en la producción *in vitro* de las proteínas o fragmentos recombinantes u otros reactivos. Además se proporcionan composiciones para uso en la liberación de una molécula heteróloga para fines terapéuticos o de vacunas. Tales composiciones terapéuticas o de vacuna contienen los vectores adenovirales que llevan una molécula heteróloga insertada. Además, las nuevas secuencias de SAdV son
- 15 útiles para proporcionar las funciones auxiliares esenciales requeridas para la producción de vectores virales adenoasociados (AAV) recombinantes. Por lo tanto, se proporcionan construcciones auxiliares, procedimientos y líneas celulares que utilizan estas secuencias en tales procedimientos de producción.
- 20 La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando está óptimamente alineado con inserciones o deleciones adecuadas de nucleótidos con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 95 a 99 % de las secuencias alineadas.
- 25 La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a aminoácidos o fragmentos de los mismos, indica que, cuando está óptimamente alineado con inserciones o deleciones adecuadas de aminoácidos con otro aminoácido (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de aminoácidos en al menos aproximadamente 95 a 99 % de las secuencias alineadas. Preferentemente, la homología es sobre la secuencia de longitud completa, o una proteína de la misma, o un fragmento de la misma que tiene una longitud de al menos 8 aminoácidos, o, más deseablemente, de al menos 15 aminoácidos. Ejemplos de fragmentos adecuados se describen en el presente documento.
- 30 La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "idéntica" en el contexto de secuencias de ácido nucleico se refiere a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima. Cuando se requieren huecos para alinear una secuencia con otra, el grado de puntuación se calcula con respecto a la secuencia más larga sin penalización por huecos. Las secuencias que conservan la funcionalidad del polinucleótido o un polipéptido codificado de ese modo son más estrechamente idénticas. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser sobre la longitud completa del genoma (por ejemplo, aproximadamente 36 kpb), se desea la longitud completa de un marco de lectura abierto de un gen, proteína, subunidad, o enzima [véase, por ejemplo, las tablas que proporcionan las regiones codificantes adenovirales], o un fragmento de al menos aproximadamente 500 a 5000 nucleótidos. Sin embargo, también puede desearse la identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 20 a 24 nucleótidos, al menos aproximadamente 28 a 32 nucleótidos, al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos. Del mismo modo, la "identidad de secuencia en porcentaje" puede determinarse fácilmente para las secuencias de aminoácidos, a lo largo de la longitud completa de una proteína, o un fragmento de la misma. Adecuadamente, un fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 8 aminoácidos y puede ser de hasta aproximadamente 700 aminoácidos. Ejemplos de fragmentos adecuados se describen en el presente documento.
- 35
- 40
- 45 La identidad se determina fácilmente utilizando este tipo de algoritmos y programas informáticos como se definen en el presente documento con los ajustes predeterminados. Preferentemente, tal identidad es sobre la longitud completa de la proteína, enzima, subunidad, o sobre un fragmento de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud. Sin embargo, la identidad puede basarse en regiones más cortas, cuando sea adecuado para el uso al que se está poniendo el producto génico idéntico.
- 50 Como se describe en el presente documento, las alineaciones se realizan utilizando cualquiera de una variedad de programas de alineación de múltiples secuencias disponibles pública o comercialmente disponibles, tales como "Clustal W", accesible a través de servidores Web en Internet [Thompson y col., 1994, Nucleic Acids Res. 22, 4673–4680]. Como alternativa, también se utilizan los servicios públicos de Vector NTI® [InVitrogen]. También hay una serie de algoritmos conocidos en la técnica que se pueden utilizar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos, incluyendo los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse utilizando Fasta, un programa en GCG Versión 6.1. Fasta proporciona alineaciones y el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda. Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico usando Fasta con sus parámetros por defecto (un tamaño de letra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) tal como se proporciona en GCG Versión 6.1. Del mismo modo se disponen de programas para realizar alineaciones de aminoácidos. En general, estos programas se utilizan en los
- 55
- 60

parámetros por defecto, aunque un experto en la técnica puede modificar estos valores según sea necesario. Como alternativa, un experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o programa de ordenador que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación como el proporcionado por los algoritmos y programas a los que se hace referencia.

5 "Recombinante", tal como se aplica a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligación y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que es distinta de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen, respectivamente, réplicas de la construcción polinucleotídica original y la progenie de la construcción del virus original.

10 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante con la que no se encuentra unido de forma natural es un promotor heterólogo. Un sitio de recombinación específico de sitio que se ha clonado en un genoma de un virus o vector viral, en el que el genoma del virus no lo contiene naturalmente, es un sitio de recombinación heteróloga. Cuando un polinucleótido con una secuencia de codificación para una recombinasa se utiliza para modificar genéticamente una célula que normalmente no expresa la recombinasa, tanto el polinucleótido como la recombinasa son heterólogos para la célula.

20 Como se usa a lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "comprenden" y sus variantes incluyendo "comprende", "que comprende", entre otras variantes, incluye componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. El término "consiste en" o "que consiste en" son exclusivos de otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

I. Las secuencias de adenovirus de simio

25 La invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de adenovirus de simio 39 (SAdV-39), que se aíslan del otro material al que están asociadas en la naturaleza. En el presente documento también se divulgan secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de adenovirus de simio 25.2 (SAdV-25.2), SAdV-26, -30, -37 y -38.

A. Secuencias de ácidos nucleicos

30 Las secuencias de ácidos nucleicos SAdV-39 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos de 1 a 36553 de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias de ácidos nucleicos SAdV-25,2 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos de 1 a 36629 de la SEQ ID NO: 130. Las secuencias de ácidos nucleicos SAdV-26 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos de 1 a 36628 de la SEQ ID NO: 162. Las secuencias de ácidos nucleicos SAdV-30 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos de 1 a 36621 de la SEQ ID NO: 98. Las secuencias de ácidos nucleicos SAdV37 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos de 1 a 36634 de la SEQ ID NO: 33. Las secuencias de ácidos nucleicos SAdV-38 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos de 1 a 36494 de la SEQ ID NO: 65. Véase el listado de secuencias adjunto.

40 En un ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos abarcan adicionalmente la hebra que es complementaria a las secuencias de SEQ ID NO: 1, 130, 162, 98, 130 o 65, respectivamente, así como las secuencias de ARN y ADNc correspondientes a las secuencias de las siguientes secuencias y sus cadenas complementarias. En otro ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos abarcan además secuencias que son más del 98,5 % idéntica, y preferentemente, más de aproximadamente el 99 % idéntica, con el Listado de Secuencias. También se incluye en un ejemplo las variantes naturales y las modificaciones mediante ingeniería de las secuencias proporcionadas en las ID NO: 1, 130, 162, 98, 130, o 65 y sus cadenas complementarias. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores que se conocen en la técnica, metilación, y sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural un nucleótido degenerado.

TABLA 1- REGIONES DE ÁCIDO NUCLEICO

Regiones	ORF de SAdV-39 ORF, SEQ ID NO: 1	ORF de SAdV-30 ORF, SEQ ID NO: 98	ORF de SAdV-25,2 ORF, SEQ ID NO: 130	ORF de SAdV-26 ORF, SEQ ID NO: 162	ORF de SAdV- 37 ORF, SEQ ID NO: 33	ORF de SAdV-38 ORF, SEQ ID NO: 65
ITR	1..126	1..126	1..126	1..131	1..127	1..130
E1a	Join	Join	Join	Join	Join	Join
13S	576..1143,	576..1143,	576..1143,	576..1140,	577..1144,	577..1144,
12S	1228..1433	1229..1434	1229..1434	1236..1441	1230..1435	1230..1435
9S	1600..2175	1601..2173	1600..2175	1603..2163	1602..2174	1601..2176
E1b	1905..3416	1906..3414	1905..3416	1908..3404	1907..3415	1906..3417
T/19K pequeña	3504..3929	3452..3922	3501..3926	3492..3917	3453..3923	3505..3930
T/55K grande	Complement. (8474..10408, 13862..13870)	Complement. (8465.0,10399, 13835.0,13843)	Complement. (8467.0,10398, 13826.0,13834)	Complement. (8465.0,10399, 13834.0,13842)	Complemento (8467..10400, 13836..13844)	Complement. (8473.0,10410, 13865.0,13873)
E2b	Complement. (5097.0,8672, 13862..13870)	Complement. (5091.0,8663, 13835.0,13843)	Complement. (5093.0,8665, 13826.0,13843)	Complement. (5085.0,8663, 13834.0,13842)	Complemento (5092..8664, 13836..13844)	Complement. (5099.0,8671, 13865.0,13873)
Polimeras a	Complement. (3994.0,5324, 5603.0,5615)	Complement. (3988.0,5318, 5597.0,5609)	Complement. (3990.0,5320, 5599.0,5611)	Complement. (3982.0,5312, 5591.0,5603)	Complemento (3989..5319, 5598..5610)	Complement. (3996.0,5326, 5605.0,5617)
IVa2						

(continuación)

TABLA 1- REGIONES DE ÁCIDO NUCLEICO							
Regiones	ORF de SAdV-39 ORF, SEQ ID NO: 1	ORF de SAdV-30 ORF, SEQ ID NO: 98	ORF de SAdV-25,2 ORF, SEQ ID NO: 130	ORF de SAdV-26 ORF, SEQ ID NO: 162	ORF de SAdV- 37 ORF, SEQ ID NO: 33	ORF de SAdV-38 ORF, SEQ ID NO: 65	
L1	52/55D	10859..12037	10826..12001	10833..12017	10612..12003	10827..12002	10871..12046
	IIIa	12064..13833	12028..13806	12044..13792	12030..13805	12029..13807	12073..13830
	L2	Pentón	13915..15510	13888..15486	13874..15466	13884..15521	13889..15514
VII		15517..16095	15493..16071	15473..16054	15528..16106	15521..16099	15536..16117
V		16140..17180	16116..17153	16102..17145	16151..17167	16144..17181	16165..17211
L3	pX	17208..17438	17177..17407	17173..17403	17195..17428	17209..17439	17239..17469
	VI	17473..18249	17442..18218	17478..18209	17461..18234	17512..18234	17542..18261
	Hexón	18359..21178	18328..21141	18315..21113	18344..21154	18328..21153	18357..21146
E2a	Endoprote asa	21202..21825	21160..21786	21136..21759	21176..21802	21172..21798	21171..21791
	DBP	Complement.(21910.. 23445)	Complement.(21871.0,23 403)	Complement.(21845.0,23 377)	Complement.(21885.0 ,23423)	Complemento (21883..23418)	Complement.(21869.0,23 404)
	L4	100 kD	23468..25870	23426..25828	23400..25790	23441..25854	23430..25814
E3	Homólogo de 33 kD	Join 25587..25917, 26087..26415	Join 25548..25875, 26045..26379	Join 25510..25837, 26007..26350	Join 25574..25901, 26071..26399	Join 26611..26940, 27215..27529	Join 25534..25861, 26031..26377
	22 kD	25587..26150	25548..26111	25510..26079	25574..26134	25560..26123	25534..26103
	VIII	26484..27164	26451..27131	26425..27105	26482..27162	26463..27143	26452..27132
E3	12,5K	27168..27485	27135..27452	27109..27426	27166..27483	27147..27464	27136..27453
	CR1-alfa	27442..28071	27409..28032	27383..28009	27440..28072	27421..28044	27410..28036

(continuación)

TABLA 1- REGIONES DE ÁCIDO NUCLEICO						
Regiones	ORF de SAdV-39 ORF, SEQ ID NO: 1	ORF de SAdV-30 ORF, SEQ ID NO: 98	ORF de SAdV-25,2 ORF, SEQ ID NO: 130	ORF de SAdV-26 ORF, SEQ ID NO: 162	ORF de SAdV- 37 ORF, SEQ ID NO: 33	ORF de SAdV-38 ORF, SEQ ID NO: 65
gp19K	28056..28583	28017..28544	27994..28527	28057..28584	28029..28556	28021..28548
CR1-beta	28616..29233	28581..29264	28560..29285	28618..29355	28593..29276	28581..29198
CR1- gamma	29249..29863	29280..29888	29301..29906	29371..29988	29292..29900	29214..29822
CR1-delta	29881..30765	29906..30769	29924..30784	30011..30883	29918..30781	29840..30703
RID-alfa	30776..31048	30780..31052	30795..31067	30895..31167	30792..31064	30714..30986
RID-beta	31057..31482	31061..31494	31076..31507	31170..31613	31073..31504	30995..31423
14,7K	31478..31882	31488..31892	31503..31907	31609..32010	31500..31904	31419..31823
L5 Fibra	31997..33463	32189..33523	32207..33535	32264..33538	32201..33535	32096..33370
E4 Orf 6/7	Complement. (33567..33815, 34529..34708)	Complement. (33628.. 33876, 34623..34772)	Complement. (33632..33880, 34603..34782)	Complement. (33635..33883, 34630..34779)	Complement. (33640..33888, 34602..34784)	Complement. (33485..33733, 34465..34635)
Orf 6	Complement. (33815..34708)	Complement. (33876..34772)	Complement. (33880..34782)	Complement. (33883..34779)	Complement. (33888..34784)	Complement. (33733..34635)
Orf 4	Complement.	Complement.	Complement.	Complement.	Complement.	Complement.
Orf 3	Complement. (34617..34979)	Complement. (34678..35043)	Complement. (34691..35053)	Complement. (34685..35050)	Complement. (34763..35055)	Complement. (34544..34906)
Orf 2	Complement. (34992..35342)	Complement. (35055..35405)	Complement. (35066..35416)	Complement. (35062..35412)	Complement. (35067..35417)	Complement. (34919..35269)
	Complement. (35342..35728)	Complement. (35405..35791)	Complement. (35416..35802)	Complement. (35412..35798)	Complement. (35417..35803)	Complement. (35269..35655)

(continuación)

TABLA 1- REGIONES DE ÁCIDO NUCLEICO

Regiones	ORF de SAdV-39 ORF, SEQ ID NO: 1	ORF de SAdV-30 ORF, SEQ ID NO: 98	ORF de SAdV-25,2 ORF, SEQ ID NO: 130	ORF de SAdV-26 ORF, SEQ ID NO: 162	ORF de SAdV- 37 ORF, SEQ ID NO: 33	ORF de SAdV-38 ORF, SEQ ID NO: 65
Orf1	Complement. (35772..36143)	Complement. (35844..36215)	Complement. (35846..36217)	Complement. 35851..36222)	Complement. (35856..36227)	Complement. (35699..36070)
ITR	Complement. (36428..36553)	Complement. (36496..36621)	Complement. (36504..36629)	Complement. (36498..36628)	Complement. (36508..36634)	Complement. (36365..36494)

En un ejemplo, se proporcionan fragmentos de las secuencias de SAdV-39, -SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38, y sus cadenas complementarias, ADNc y ARN complementarios a los mismos. Los fragmentos adecuados tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos y abarcan fragmentos funcionales, es decir, fragmentos que son de interés biológico. Por ejemplo, un fragmento funcional puede expresar un producto adenoviral deseado o puede ser útil en la producción de vectores virales recombinantes. Tales fragmentos incluyen las secuencias de genes y fragmentos listados en las tablas en el presente documento. Las tablas proporcionan las regiones de transcripción y los marcos de lectura abierta en las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38. Para ciertos genes, los transcritos y los marcos de lectura abierta (ORF) se encuentran en la cadena complementaria a la presentada en la SEC ID N° 1, 130, 162, 98, 130, o 65, es decir, por ejemplo, E2b, E4 y E2a. También se muestran los pesos moleculares calculados de las proteínas codificadas. Debe tenerse en cuenta que el marco de lectura abierta E1a de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 y el marco de lectura abierta E2b contienen sitios de corte y empalme internos. Estos sitios de corte y empalme se indican en la tabla anterior.

Las secuencias de ácidos nucleicos adenovirales de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 son útiles como agentes terapéuticos y en la construcción de diversos sistemas de vectores y células huésped. Tal como se usa en el presente documento, un vector incluye cualquier molécula de ácido nucleico adecuada incluyendo ADN desnudo, un plásmido, un virus, un cósmido, o un episoma. Estas secuencias y productos pueden usarse solos o en combinación con otras secuencias adenovirales o fragmentos, o en combinación con elementos de otras secuencias adenovirales o no adenovirales. Las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 también son útiles como vectores de liberación antisentido, vectores de terapia génica o vectores de vacunas. Por lo tanto, además se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos, vectores liberación de genes y células huésped que contienen las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38.

Por ejemplo, la divulgación abarca una molécula de ácido nucleico que contiene ITR de Ad de simio. En otro ejemplo se proporciona una molécula de ácido nucleico que contiene secuencias Ad de simio que codifican un producto génico de Ad deseado. Todavía otra molécula de ácido nucleico más construida usando las secuencias divulgadas será fácilmente evidente para un experto en la técnica, en vista de la información proporcionada en el presente documento.

En un ejemplo, las regiones del gen Ad de simio identificadas en el presente documento se pueden usar en varios vectores para la liberación de una molécula heteróloga a una célula. Por ejemplo, se generan vectores para la expresión de una proteína de la cápside adenoviral (o fragmento de la misma) para los fines de la generación de un vector viral en el empaquetamiento de una célula huésped. Tales vectores pueden diseñarse para la expresión en *trans*. Como alternativa, dichos vectores están diseñados para proporcionar células que contienen de manera estable secuencias que expresan las funciones adenovirales deseadas, por ejemplo, uno o más de E1a, E1b, las secuencias de repetición terminales, región E2a, E2b, E4, E4ORF6.

Además, las secuencias de genes adenovirales y fragmentos de los mismos son útiles para proporcionar las funciones auxiliares necesarias para la producción de virus auxiliares dependientes (por ejemplo, vectores adenovirales que carecen de las funciones esenciales, o virus adenoasociados (AAV)). Para tales procedimientos de producción, las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden usarse en un procedimiento de este tipo de una manera similar a las descritas para el Ad humano. Sin embargo, debido a las diferencias en las secuencias entre las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 y las de Ad humano, el uso de las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 minimizan considerablemente o eliminan la posibilidad de recombinación homóloga con funciones auxiliares en una célula huésped portadora de las funciones de Ad E1, por ejemplo células 293, que pueden producir contaminantes adenovirales infecciosos durante la producción de rAAV.

Los procedimientos para producir rAAV utilizando funciones auxiliares adenovirales se han descrito ampliamente en la literatura con los serotipos de adenovirus humanos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6.258.595 y las referencias citadas en la misma. Véase, también, la patente de Estados Unidos 5.871.982; el documento WO 99/14354; el documento WO 99/15685; el documento WO 99/47691. Estos procedimientos también se pueden utilizar en la producción de AAV de serotipo no humano, incluidos los serotipos de AAV de primates no humanos. Las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 que proporcionan las funciones auxiliares necesarias (por ejemplo, ORF6 de E1a, E1b, E2a y / o E4) pueden ser particularmente útiles para proporcionar la función adenoviral necesaria al tiempo que se reduce al mínimo o se elimina la posibilidad de recombinación con cualquier otro adenovirus presentes en la célula de empaquetamiento de rAAV que son típicamente de origen humano. Por tanto, los genes seleccionados o marcos de lectura abiertos de las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden usarse en estos procedimientos de producción de rAAV.

Como alternativa, en estos procedimientos pueden usarse los vectores recombinantes de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38. Tales vectores de simio adenovirales recombinantes pueden incluir, por ejemplo, un Ad/AAV híbrido de chimpancé en el que las secuencias de Ad de chimpancé flanquean un casete de expresión de rAAV compuesto por, por ejemplo, AAV 3' y / o ITR en 5' y un transgén bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. Un experto en la técnica reconocerá que todavía otros vectores adenovirales de simio y / o las secuencias génicas de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 serán útiles para la producción de rAAV y otros virus dependientes del auxiliar adenoviral.

En todavía otro ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos están diseñadas para la liberación y la expresión de productos génicos adenovirales seleccionados en una célula huésped para lograr un efecto fisiológico deseado. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que contiene secuencias que codifican una proteína E1a de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se puede administrar a un sujeto para su uso como terapéutica para el cáncer. Opcionalmente, dicha molécula se formula en un vehículo a base de lípidos y preferentemente se dirige a las células cancerosas. Tal formulación se puede combinar con otras terapias contra el cáncer (por ejemplo, cisplatino, taxol, o similares). Sin embargo, otros usos para las secuencias adenovirales proporcionadas en el presente documento serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

Además, un experto en la técnica entenderá fácilmente que las secuencias de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden adaptarse fácilmente para su uso para diversos sistemas de vectores virales y no virales para la liberación in vitro, ex vivo o in vivo de moléculas terapéuticas e inmunogénicas. Por ejemplo, las secuencias de Ad de simio SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden usarse en diversos sistemas de vectores rAd y no-rAd. Dichos sistemas de vectores pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, lentivirus, retrovirus, virus de la viruela, virus vacunales y los sistemas virales adenoasociados, entre otros. La selección de estos sistemas de vectores no es una limitación de la presente invención.

La divulgación proporciona adicionalmente moléculas útiles para la producción de las proteínas de simio y derivadas de simio divulgadas en el presente documento. Tales moléculas que portan polinucleótidos que incluyen las secuencias de ADN de Ad divulgadas en el presente documento pueden estar en forma de ADN desnudo, un plásmido, un virus o cualquier otro elemento genético.

B. Proteínas adenovirales SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38

En el presente documento se proporcionan productos génicos de los adenovirus SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38, tales como proteínas, enzimas y fragmentos de los mismos, que están codificadas por los ácidos nucleicos adenovirales descritos en el presente documento. También se abarcan proteínas de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38, enzimas y fragmentos de las mismas, que tienen las secuencias de aminoácidos codificadas por estas secuencias de ácidos nucleicos que se generan por otros procedimientos. Tales proteínas incluyen las codificadas por los marcos de lectura abierta identificados en la tabla anterior, las proteínas identificadas en las tablas siguientes con referencia a la SEQ ID NO, que se proporcionan en el listado de secuencias) y fragmentos de las mismas de las proteínas y polipéptidos.

SECUENCIAS DE PROTEÍNAS							
Regiones		SEQ ID NO: de SAdV -39	SEQ ID NO: de SAdV -30	SEQ ID NO: de SAdV 25,2	SEQ ID NO: de SAdV -37	SEQ ID NO: de SAdV -38	SEQ ID NO: de SAdV -26
E1a	13S	30	127	159	62	95	191
	12S						
	9S						
E1b	T/19K pequeña	24	120	153	56	89	185
	T/55K grande	2	99	131	34	66	163
	IX	3	100	132	35	67	164
L1	52/55D	4	101	133	36	68	165
	IIIa	5	102	134	37	69	166
L2	Pentón	6	103	135	38	70	167
	VII	7	104	136	39	71	168
	V	8	105	137	40	72	169
	pX	9	106	138	41	73	170

(cotinuación)

SECUENCIAS DE PROTEÍNAS							
Regiones		SEQ ID NO: de SAdV -39	SEQ ID NO: de SAdV -30	SEQ ID NO: de SAdV 25,2	SEQ ID NO: de SAdV -37	SEQ ID NO: de SAdV -38	SEQ ID NO: de SAdV -26
L3	VI	10	107	139	42	74	171
	Hexón	11	108	140	43	75	172
	Endoproteasa	12	109	141	44	76	173
L4	100 kD	13	110	142	45	77	174
	Homólogo de 33 kD	32	129	161	64	97	193
	22 kD	26	122	155	58	91	187
	VIII	14	111	143	46	78	175
E3	12,5 k	15	123	144	47	79	176
	CR1-alfa	27	112	156	59	92	188
	gp19K	16	124	145	48	87	177
	CR1-beta	17	113	146	49	80	178
	CR1-gamma	18	114	147	50	81	179
	CR1-delta	19	115	148	51	82	180
	RID-alfa	20	116	149	52	83	181
	RID-beta	21	117	150	53	93	182
	14,7 K	28	125	158	60	84	189
L5	Fibra	22	118	151	54	85	183

5 Por tanto, en un aspecto, se proporcionan proteínas de adenovirus de simio únicas que son sustancialmente puras, es decir, que carecen de de otras proteínas virales y proteináceas. Preferentemente, estas proteínas son al menos 10 % homogéneas, más preferentemente 60 % homogénea, y lo más preferentemente 95 % homogéneas.

10 En un ejemplo, se proporcionan proteínas únicas de la cápside derivada de simio. Como se usa en el presente documento, una proteína de la cápside derivada de simio incluye cualquier proteína de la cápside adenoviral que contiene una proteína de la cápside SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 o un fragmento de la misma, incluyendo, sin limitaciones, proteínas quiméricas de la cápside, proteínas de fusión, proteínas artificiales de la cápside, proteínas sintéticas de la cápside y proteínas recombinantes de la cápside, sin limitaciones, a los medios de generación de estas proteínas.

15 Adecuadamente, estas proteínas de la cápside derivadas de simio contienen una o más regiones de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 o fragmentos de las mismas (por ejemplo, una hexón, pentón, fibra, fragmento de los mismos) en combinación con las regiones de la cápside o fragmentos de las mismas de diferentes serotipos adenovirales, o proteínas de la cápside de simio modificadas o fragmentos, como se describe en el presente documento. Una "modificación de una proteína de la cápside asociada con tropismo alterado" tal como se utiliza en el presente documento incluye una proteína alterada de la cápside, es decir, una región pentón, hexón o proteína de fibra, o fragmento de los mismos, tal como el dominio *Knob* o de la región de la fibra, o un polinucleótido que codifica la misma, de forma que se altera la especificidad. La cápside derivada de simio puede construirse con uno o más de los serotipos de Ad de simio divulgados en el presente documento u otro serotipo de Ad que puede ser de origen humano o no humano. Dicho Ad puede obtenerse a partir de diversas fuentes, incluyendo la ATCC, fuentes comerciales y académicas, o las secuencias de la Ad pueden obtenerse de GenBank u otras fuentes adecuadas.

20 Se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas pentónicas de SAdV-39 [SEC ID N° 6], SAdV-25,2

[SEC ID N° 135], -26 [SEQ ID NO:167], -30 [SEQ ID NO:103], -37 [SEQ ID NO: 38] o -38 [SEQ ID NO: 70]. Adecuadamente, esta proteína pentónica, o fragmentos únicos de la misma, puede usarse para varios fines. Ejemplos de fragmentos adecuados incluyen el pentón que tiene truncamientos en N-terminal y / o en C-terminal de aproximadamente 50, 100, 150 o 200 aminoácidos, en base a la numeración de aminoácidos proporcionada anteriormente y en las SEQ ID NO:6, 103, 135, 38, 70, 167 o 70. Otros fragmentos adecuados incluyen fragmentos internos más cortos, en C-terminal o en N-terminal. Además, la proteína pentónica puede modificarse para diversos fines conocidos por los expertos en la materia.

También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas hexónicas SAdV-39 [SEQ ID NO: 11], SAdV-25.2 [SEQ ID NO:140], -26 [SEQ ID NO: 172], -30 [SEQ ID NO: 108], -37 [SEQ ID NO: 43] o -38 [SEQ ID NO: 75]. Adecuadamente, esta proteína hexónica, o fragmentos únicos de la misma, puede usarse para varios fines. Ejemplos de fragmentos adecuados incluyen el hexón que tiene truncamientos en N-terminal y / o en C-terminal de aproximadamente 50, 100, 150, 200, 300, 400, o 500 aminoácidos, en base a la numeración de aminoácidos proporcionada anteriormente y en las SEC ID N° 11, 140, 172, 108, 43 o 75. Otros fragmentos adecuados incluyen fragmentos más cortos internos, en C-terminal o en N-terminal. Por ejemplo, un fragmento adecuado de la región del bucle (dominio) de la proteína hexónica, designada DE1 y FG1, o de una región hipervariable de la misma. Tales fragmentos incluyen las regiones que abarcan los residuos de aminoácidos de aproximadamente 125 a 443; de aproximadamente 138 a 441, o fragmentos más pequeños, tales como los que abarcan aproximadamente del residuo 138 hasta el residuo 163; de aproximadamente 170 a aproximadamente 176; de aproximadamente 195 a aproximadamente 203; de aproximadamente 233 a aproximadamente 246; de aproximadamente 253 a aproximadamente 374; de aproximadamente 287 a aproximadamente 297; y de aproximadamente 404 a aproximadamente 430 de las proteínas hexónicas de simio, con referencia a las SEC ID N° 11, 140, 172, 108, 43 o 75. Otros fragmentos adecuados pueden ser identificados fácilmente por un experto en la técnica. Además, la proteína hexónica puede modificarse por diversos fines conocidos por los expertos en la técnica. Debido a que la proteína hexónica es el factor determinante para el serotipo de un adenovirus, tales proteínas hexónicas artificiales darían lugar a adenovirus que tienen serotipos artificiales. Otras proteínas artificiales de la cápside también pueden construirse usando las secuencias pentónicas de Ad de chimpancé / o las secuencias de la fibra y / o fragmentos de las mismas.

En un ejemplo, se puede generar un adenovirus que tiene una proteína hexónica alterada utilizando las secuencias de una proteína hexónica de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38. Un procedimiento adecuado para alterar las proteínas hexónicas e describe en la patente de EE.UU. 5.922.315. En este procedimiento, al menos una región de bucle del hexón del adenovirus se cambia con al menos una región de bucle de otro serotipo de adenovirus. Por lo tanto, al menos una región de bucle de una proteína hexónica de adenovirus alterada de este tipo es una región de bucle hexónica de Ad hexón de simio de SAdV-39. En un ejemplo, una región de bucle de la proteína hexónica de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se sustituye por una región de bucle de otro serotipo de adenovirus. En otro ejemplo, la región del bucle del hexón de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se utiliza para sustituir una región de bucle de otro serotipo de adenovirus. Los serotipos de adenovirus adecuados pueden seleccionarse fácilmente de entre los serotipos humanos y no humanos, como se describe en el presente documento. La selección de un serotipo adecuado no es una limitación de la presente invención. Sin embargo, otros usos para las secuencias de la proteína hexónica de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

Se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la fibra de SAdV-39 [SEQ ID NO:22], SAdV-25.2 [SEQ ID NO: 151], -26 [SEQ ID NO: 183], -30 [SEQ ID NO: 118], -37 [SEQ ID NO: 54] o -38 [SEQ ID NO: 85]. Adecuadamente, esta proteína de la fibra, o fragmentos únicos de las mismas, pueden usarse para varios fines. Un fragmento adecuado es el nudo de la fibra, localizado en las SEQ ID NO: 22, 151, 183, 119, 54 o 85. Ejemplos de otros fragmentos adecuados incluyen la fibra que tiene truncamientos en N-terminal y / o en C-terminal de aproximadamente 50, 100, 150, o 200 aminoácidos, en base a la numeración de aminoácidos proporcionada en las SEC ID N° 22, 151, 183, 119, 54 u 85. Aún otros fragmentos adecuados incluyen fragmentos internos. Además, la proteína de la fibra puede modificarse usando diversas técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Los fragmentos únicos de las proteínas de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 tienen una longitud de al menos 8 aminoácidos. Sin embargo, fragmentos de otras longitudes deseadas pueden usarse fácilmente. Además, en el presente documento se proporcionan modificaciones como se pueden introducir para mejorar el rendimiento y / o la expresión de un producto génico de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38, por ejemplo, la construcción de una molécula de fusión en la que la totalidad o un fragmento del producto génico de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se fusiona (ya sea directamente o mediante un enlazador) con una pareja de fusión para potenciar. Otras modificaciones adecuadas incluyen, sin limitación, el truncamiento de una región de codificación (por ejemplo, una proteína o enzima) para eliminar una pre o pro-proteína normalmente escindida y para proporcionar a la proteína madura o una enzima y / o mutación de una región de codificación para proporcionar un producto génico secretable. Aún otras modificaciones serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Además se abarcan proteínas que tienen una identidad de al menos aproximadamente 99 % con las proteínas de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 proporcionadas en este documento.

Como se describe en el presente documento, los vectores que contienen las proteínas de la cápside adenoviral de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 son particularmente adecuados para su uso en aplicaciones en las que

los anticuerpos neutralizantes disminuyen la efectividad de otros vectores basados en el serotipo de Ad, así como otros vectores virales. Los vectores rAd son particularmente ventajosos la readministración para repetir la terapia génica o para reforzar la respuesta inmunitaria (títulos de vacunas).

5 En ciertas circunstancias, puede ser deseable utilizar uno o más de los productos génicos de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 (por ejemplo, una proteína de la cápside o un fragmento de la misma) para generar un anticuerpo. El término "un anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo. Los anticuerpos pueden existir en diversas formas, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos policlonales de alta afinidad, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes y anticuerpos humanizados. Tales anticuerpos se originan a partir de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

10 Dichos anticuerpos pueden generarse usando cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos adecuados se pueden generar mediante técnicas convencionales bien conocidas, por ejemplo, Kohler y Milstein, y las muchas modificaciones conocidas de las mismas. Se generan títulos altos de anticuerpos deseables de forma similar mediante la aplicación de técnicas recombinantes conocidas a los anticuerpos monoclonales o policlonales desarrollados para estos antígenos [véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT N.º WO 86/01533; la publicación de solicitud de patente británica N.º GB2188638A; Amit y col., 1986 Science, 233: 747-753; Queen y col., 1989 Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033; la solicitud de patente PCT n.º WO 90/07861; y Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1988); Huse y col., 1988a Science, 246:1275-1281]. Como alternativa, los anticuerpos pueden producirse mediante la manipulación de las regiones determinantes de la complementariedad de anticuerpos animales o humanos frente al antígeno como se ha divulgado en el presente documento. Véase, por ejemplo, E. Mark y Padlin, "Humanization of Monoclonal Antibodies", Capítulo 4, The Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 113, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag (junio de 1994); Harlow y col., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow y col., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; y Bird y col., 1988, Science 242:423-437. También se proporcionan anticuerpos anti-idiotipo (Ab2) y anticuerpos anti-anti-idiotipo (Ab3). Véase, por ejemplo, M. Wettendorff y col., "Modulation of anti-tumor immunity by anti-idiotypic antibodies." En Idiotypic Network and Diseases, ed. de J. Cerny y J. Hiernaux, 1990 J. Am. Soc. Microbiol., Washington DC: pág. 203-229]. Estos anticuerpos anti-idiotipo y anti-anti-idiotipo se producen utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos anticuerpos pueden usarse para diversos fines, incluyendo procedimientos y kits de diagnóstico y clínicos.

15 En ciertas circunstancias, puede ser deseable introducir un marcador detectable o un marcador sobre el producto génico de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38, anticuerpo u otra construcción. Tal como se usa en el presente documento, un marcador detectable es una molécula que es capaz, por sí sola o tras la interacción con otra molécula, de proporcionar una señal detectable. Lo más deseablemente, el marcador es detectable visualmente, por ejemplo, mediante fluorescencia, para su fácil uso en los análisis de inmunohistoquímica o microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, los marcadores adecuados incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), colorantes de corifosfina-O (CPO) o en tándem, PE-cianina-5 (PC5) y PE-rojo Texas (ECD). Todos estos colorantes fluorescentes están disponibles comercialmente, y sus usos se conocen en la técnica. Otros marcadores útiles incluyen un marcador de oro coloidal. Otros marcadores útiles más incluyen compuestos o elementos radiactivos. Además, los marcadores incluyen diversos sistemas enzimáticos que operan para revelar una señal colorimétrica en un ensayo, por ejemplo, glucosa oxidasa (que utiliza glucosa como sustrato), libera peróxido como un producto que, en presencia de peroxidasa y un donante de hidrógeno, tal como tetrametil bencidina (TMB), produce un TMB oxidado que se ve como un color azul. Otros ejemplos incluyen peroxidasa de rábano (HRP), fosfatasa alcalina (AP), y hexoquinasa junto con glucosa-6-fosfato que reacciona deshidrogenasa que reacciona con ATP, glucosa y NAD + para producir, entre otros productos, NADH que se detecta como un aumento de la absorbancia a la longitud de onda de 340 nm.

20 Otros sistemas de marcadores que se utilizan en los procedimientos descritos aquí son detectables por otros medios, por ejemplo, micropartículas de látex coloreadas [Bangs Laboratories, Indiana] en las que se usa un colorante está incluido en lugar de enzimas para formar conjugados con las secuencias diana proporcionan una visual señal indicativa de la presencia del complejo resultante en ensayos aplicables.

25 Los procedimientos para el acoplamiento o la asociación del marcador con una molécula deseada son igualmente convencionales y conocidos para los expertos en la técnica. Se describen los procedimientos conocidos de unión del marcador [véase, por ejemplo, Handbook of Fluorescent probes and Research Chemicals, 6ª Ed., R. P. M. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 1996; Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1994/1995]. Por lo tanto, la selección del marcador y los procedimientos de acoplamiento no limitan esta invención.

30 Las secuencias, las proteínas y los fragmentos SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden producirse por cualquier medio adecuado, incluyendo la producción recombinante, la síntesis química, u otros medios sintéticos. Las técnicas de producción adecuadas son bien conocidas para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY). Como alternativa, los péptidos también pueden sintetizarse mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase

sólida bien conocidos (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1962); Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) pág. 27–62). Estos y otros procedimientos de producción adecuados están dentro del conocimiento de los expertos en la técnica y no son una limitación de la presente invención.

Además, un experto en la técnica entenderá fácilmente que las secuencias de SAdV–39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 pueden adaptarse fácilmente para su uso para diversos sistemas de vectores virales y no virales para la liberación in vitro, ex vivo o in vivo de moléculas terapéuticas e inmunogénicas. Por ejemplo, en un ejemplo, las proteínas de la cápside de Ad de simio y otras proteínas de adenovirus de simio descritas en este documento se utilizan para la liberación no viral a base de proteínas de los genes, las proteínas y otras moléculas de diagnóstico, terapéuticas e inmunogénicas deseables. En un ejemplo de este tipo, una proteína, como se divulga en el presente documento se une, directa o indirectamente, a una molécula para dirigir a las células con un receptor de adenovirus. Preferentemente, para dicha orientación se selecciona una proteína de la cápside tal como un hexón, pentón, fibra o un fragmento de las mismas que tiene un ligando para un receptor de superficie celular. Las moléculas adecuadas para su liberación se seleccionan de entre las moléculas terapéuticas descritas en este documento y sus productos génicos. Varios enlazadores, incluyendo, lípidos, PoliLys, y similares, pueden usarse como enlazadores. V para ejemplo, la proteína pentónica de simio se puede utilizar fácilmente para tal propósito mediante la producción de una proteína de fusión usando las secuencias pentónicas de simio de una manera análoga a la descrita en Medina-Kauwe LK, y col., Gene Ther. 2001 May; 8(10):795-803 y Medina-Kauwe LK, y col., Gene Ther. 2001 Dec; 8 (23): 1753–1761. Como alternativa, las secuencias de aminoácidos de la proteína de Ad IX de simio se pueden utilizar para dirigir vectores a un receptor de superficie celular, tal como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. 20010047081. Los ligandos adecuados incluyen un antígeno CD40, una secuencia que contiene RGD o polilisina, y similares. Todavía otras proteínas de Ad de simio, incluyendo, por ejemplo, la proteína hexónica y / o la proteína de la fibra, pueden usarse para estos fines y otros similares.

Todavía otras proteínas adenovirales SAdV–39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 se pueden usar solas o en combinación con otra proteína adenoviral para diversos fines que serán evidentes para un experto en la materia. Además, todavía otros usos para las proteínas adenovirales SAdV serán evidentes para un experto en la materia.

II. Vectores adenovirales recombinantes

Las composiciones descritas en la presente invención incluyen vectores que liberan una molécula heteróloga a las células, para fines terapéuticos o de vacunas. Como se usa en este documento, un vector puede incluir cualquier elemento genético, incluyendo, sin limitaciones, ADN desnudo, un fago, transposón, cósmido, episoma, plásmido, o un virus. Tales vectores contienen ADN de adenovirus de simio de SAdV39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 y un minigén. Por "minigén" o "casete de expresión" se entiende la combinación de un gen heterólogo seleccionado y los otros elementos reguladores necesarios para impulsar la traducción, transcripción y / o expresión del producto génico en una célula huésped.

Típicamente, un vector adenoviral derivado de SAdV–39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 está diseñado de tal modo que el minigén está situado en una molécula de ácido nucleico que contiene otras secuencias adenovirales en la región nativa de un gen adenoviral seleccionado. El minigén puede insertarse en una región del gen existente para interrumpir la función de esa región, si se desea. Como alternativa, el minigén puede insertarse en el sitio de un gen adenoviral parcial o totalmente deletado. Por ejemplo, el minigén puede localizarse en el sitio de la tales como el sitio de una delección funcional de E1 o delección funcional de E3 entre otras que pueden seleccionarse. La expresión "delección funcionalmente" o "delección funcional" significa que se elimina una cantidad suficiente de la región del gen se elimina o daña de otro modo, por ejemplo, mediante mutación o modificación, de modo que la región del gen ya no es capaz de producir productos funcionales de la expresión génica. Si se desea, se puede eliminar toda la región del gen. Otros sitios adecuados para la interrupción o delección génica se tratan en otras partes de la solicitud,

Por ejemplo, para un vector de producción útil para la generación de un virus recombinante, el vector puede contener el minigén y, el extremo 5' del genoma adenoviral o el extremo 3' del genoma adenoviral, o en ambos extremos 5' y 3' del genoma adenoviral. El extremo 5' del genoma adenoviral contiene los elementos cis 5' necesarios para el empaquetamiento y la replicación; es decir, las secuencias de repetición terminal invertidas (ITR) (que funcionan como orígenes de replicación) y los dominios potenciadores del empaquetamiento nativos en 5' (que contienen las secuencias necesarias para el empaquetamiento de los genomas de Ad lineales y los elementos potenciadores para el promotor de E1). El extremo 3' del genoma adenoviral incluye los elementos cis en 3' (incluyendo las ITR) necesarios para el empaquetamiento y la encapsidación. De manera adecuada, un adenovirus recombinante contiene los elementos cis adenovirales en 5' y 3' y el minigén se localiza entre las secuencias adenovirales en 5' y 3'. Un vector adenoviral basado en SAdV–39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 también puede contener secuencias adenovirales adicionales.

Adecuadamente, estos vectores adenovirales basados en SAdV–39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 contienen uno o más elementos adenovirales derivados del genoma adenoviral divulgado en el presente documento. En un ejemplo, los vectores contiene ITR adenovirales de SAdV39, SAdV–25.2, –26, –30, –37 o –38 y secuencias adenovirales adicionales del mismo serotipo adenoviral. En otro ejemplo, los vectores contienen secuencias adenovirales que derivan de un serotipo adenoviral diferente que el que proporciona las ITR.

Como se define aquí, un adenovirus pseudotipado se refiere a un adenovirus en el que la proteína de la cápside del adenovirus es de un adenovirus diferente al adenovirus que proporciona las ITR.

Además, los adenovirus quiméricos o híbridos pueden construirse utilizando los adenovirus descritos en el presente documento usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, el documento US 7.291.498.

La selección de la fuente adenoviral de los ITR y la fuente de cualesquier otra secuencia adenoviral presentes en el vector no es una limitación de la presente realización. Hay diversas cepas de adenovirus disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia, o disponibles por solicitud de diversas fuentes comerciales e institucionales. Adicionalmente, las secuencias de muchas de estas cepas están disponibles a partir de diversas bases de datos incluyendo, por ejemplo, PubMed y GenBank. Los vectores de adenovirus homólogos preparados a partir de otros adenovirus de simios o humanos se describen en la literatura publicada [véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.240.846]. Las secuencias de ADN de una serie de tipos de adenovirus están disponibles en GenBank, incluyendo el tipo Ad5 [N° de Acceso en GenBank M73370]. Las secuencias de adenovirus se pueden obtener de cualquier serotipo de adenovirus conocido, tales como los serotipos 2, 3, 4, 7, 12 y 40, e incluyendo además cualquiera de los tipos humanos identificados actualmente. Del mismo modo, también se pueden usar adenovirus que se sabe que infectan a animales no humanos (por ejemplo, simios) en las construcciones de vectores divulgadas en el presente documento. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.083.716.

Las secuencias virales, virus auxiliares (si es necesario) y partículas virales recombinantes, y otros componentes del vector y las secuencias usadas en la construcción de los vectores descritos en este documento se obtienen como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de ADN de las secuencias de adenovirus de simio SAAdV39, SAAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se usan para construir vectores y líneas celulares útiles en la preparación de tales vectores.

Se pueden generar modificaciones de las secuencias de ácidos nucleicos que forman los vectores divulgados en el presente documento, incluyendo deleciones, inserciones y otras mutaciones en las secuencias utilizando técnicas estándar de biología molecular y están dentro del alcance de este ejemplo.

A. El "minigén"

Los procedimientos usados para la selección del transgén, la clonación y construcción del "minigén" y su inserción en el vector viral están dentro de la experiencia en la técnica dadas las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

1. El transgén

El transgén es una secuencia de ácido nucleico heteróloga con respecto a las secuencias del vector que flanquean el transgén, que codifica un polipéptido, proteína, u otro producto, de interés. La secuencia de codificación del ácido nucleico está unida operativamente a componentes reguladores de una manera que permite la transcripción, traducción, y / o expresión del transgén en una célula huésped.

La composición de la secuencia transgénica dependerá del uso que se dará al vector resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia transgénica incluye una secuencia indicadora, que tras la expresión produce una señal detectable. Dichas secuencias indicadoras incluyen, sin limitación, secuencias de ADN que codifican β -lactamasa, β -Galactosidasa (LacZ), fosfatasa alcalina, timidina quinasa, proteína fluorescente verde (GFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, proteínas unidas a la membrana, incluidas, por ejemplo, CD2, CD4, CD8, la proteína hemaglutinina de la gripe, y otras bien conocidas en la técnica, contra las que existen anticuerpos de alta afinidad dirigidos a las mismas o se pueden producir por medios convencionales, y proteínas de fusión que comprenden una proteína unida a la membrana fusionada apropiadamente a un dominio marcador de antígeno de, entre otras, hemaglutinina o Myc. Estas secuencias de codificación, cuando se asocian a elementos reguladores que dirigen su expresión, proporcionan señales detectables por medios convencionales, incluyendo ensayos enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescencia u otros ensayos espectrográficos, ensayos de clasificación celular de activación fluorescente y ensayos inmunológicos, incluyendo el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunohistoquímica. Por ejemplo, cuando la secuencia marcadora es el gen LacZ, la presencia del vector portador de la señal se detecta mediante ensayos para determinar la actividad beta-galactosidasa. Cuando el transgén es GFP o luciferasa, el vector portador de la señal puede medirse visualmente mediante la producción de color de luz en un luminómetro.

En un ejemplo, el transgén es una secuencia no marcadora que codifica un producto que es útil en biología y medicina, tales como proteínas, péptidos, ARN, enzimas, o ARN catalíticos. Moléculas de ARN deseables incluyen ARNT, ARNdc, ARN ribosómico, ARN catalítico, y ARN antisentido. Un ejemplo de una secuencia de ARN útil es una secuencia que extingue la expresión de una secuencia de ácido nucleico objetivo en el animal tratado.

El transgén se puede usar para el tratamiento de, por ejemplo, deficiencias genéticas, como terapéutico para cáncer o vacuna, para la inducción de una respuesta inmunitaria y / o con fines de vacuna profiláctica. Como se utiliza aquí, la inducción de una respuesta inmunitaria se refiere a la capacidad de una molécula (por ejemplo, un producto génico) para inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T y/o humoral frente a la molécula. La divulgación incluye

adicionalmente el uso de múltiples transgenes para, por ejemplo, corregir o mejorar una afección causada por una proteína de varias subunidades. En ciertas situaciones, puede usarse un transgén diferente para codificar cada subunidad de una proteína o para codificar diferentes péptidos o proteínas. Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica la subunidad de la proteína es grande, por ejemplo, para una inmunoglobulina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o una proteína distrofina. A fin de que la célula produzca la proteína de múltiples subunidades, una célula se infecta con el virus recombinante que contiene cada una de las diferentes subunidades. Como alternativa, el mismo transgén puede codificar diferentes subunidades de una proteína. En este caso, un solo transgén incluye el ADN que codifica cada una de las subunidades, con el ADN para cada subunidad separado por un sitio interno de entrada para la ribozima (IRES). Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica cada una de las subunidades es pequeño, por ejemplo, el tamaño total del ADN que codifica las subunidades y el IRES es menor de cinco kilobases. Como alternativa a un IRES, el ADN puede estar separado por secuencias que codifican un péptido 2A, que se autoescinde en un acontecimiento postraduccional. Véase, por ejemplo, M.L. Donnelly, y col., J. Gen. Virol., 78(Pt 1):13-21 (enero de 1997); Furler, S., y col., Gene Ther., 8(11):864-873 (junio de 2001); Klump H., y col., Gene Ther., 8(10):811-817 (mayo de 2001). Este péptido 2A es significativamente más pequeño que un IRES, lo que lo convierte en muy adecuado para utilizar cuando el espacio es un factor limitante. Sin embargo, el transgén seleccionado puede codificar cualquier producto biológicamente activo u otro producto, por ejemplo, un producto deseable para su estudio.

Un experto en la técnica puede seleccionar transgenes adecuados fácilmente. La selección del transgén no se considera una limitación de este ejemplo.

2. Elementos reguladores

Además de los elementos principales identificados anteriormente para el minigén, el vector también incluye elementos de control convencionales necesarios que están unidos operativamente al transgén de una manera que permite su transcripción, traducción y / o expresión en una célula transfectada con el vector plasmídico o infectada con el virus divulgado en el presente documento. Como se usa en el presente documento, secuencias "operablemente unidas" incluyen secuencias de control de la expresión que son contiguas al gen de interés y secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias adecuadas de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; señales eficientes del procesamiento de ARN, tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación (poli A); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad proteica; y, cuando se desee, secuencias que potencian la secreción del producto codificado.

En la técnica se conoce un gran número de secuencias de control de la expresión, incluyendo los promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y / o específicos de tejido, y pueden usarse. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitaciones, el virus retroviral del sarcoma de Rous (VSR), el promotor LTR (opcionalmente con el potenciador del VSR), el (CMV), el promotor del citomegalovirus (opcionalmente con el potenciador del CMV) [véase, por ejemplo, Boshart y col., Cell, 41: 521 a 530 (1985)], el promotor del SV40, el promotor de la dihidrofolato reductasa, el promotor de la β -actina, el promotor de la fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor de EF1 α [Invitrogen].

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden estar regulados por compuestos suministrados de forma exógena, factores ambientales tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o solo en las células en replicación. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a partir de diversas fuentes comerciales, incluyendo, sin limitaciones, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y un experto en la técnica los puede seleccionar fácilmente. Por ejemplo, los promotores inducibles incluyen el promotor de la metalotionina de oveja (MT) inducible con cinc y el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex). Otros sistemas inducibles incluyen el sistema del promotor de la polimerasa de T7 [documento WO 98/10088]; el promotor de ecdisona de insectos [No y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 93: 3346 hasta 3351 (1996)], el sistema reprimible por tetraciclina [Gossen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89: 5.547 a 5.551 (1992)], el sistema inducible por tetraciclina [Gossen y col., Science, 378: 1766 hasta 1769 (1995), véase también Harvey y col., Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518 (1998)]. Otros sistemas incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 usando castradiol, difenol murislerona, el sistema inducible por RU486 [Wang y col., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) y Wang y col., Gene Ther., 4:432-441 (1997)] y el sistema inducible por rapamicina [Magari y col., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)]. La eficacia de algunos promotores inducibles aumenta a lo largo del tiempo. En tales casos se puede potenciar eficacia de tales sistemas insertando varios represores en tándem, por ejemplo, TetR unido a un TetR a través de un IRES. Como alternativa, se puede esperar al menos 3 días antes de la detección selectiva de la función deseada. Se puede potenciar la expresión de las proteínas deseadas por medios conocidos para potenciar eficacia de este sistema. Por ejemplo, utilizando el elemento regulador postraduccional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

En otra realización, se utilizará el promotor nativo para el transgén. Puede preferirse el promotor nativo cuando se desea que la expresión del transgén imite la expresión nativa. El promotor nativo se puede utilizar cuando la

expresión del transgén debe regularse temporalmente, o en términos de desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En un ejemplo adicional, también se pueden usar otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso Kozak, para imitar la expresión nativa.

- 5 Otro ejemplo del transgén incluye un transgén unido operablemente a un promotor específico de tejido. Por ejemplo, si se desea la expresión en el músculo esquelético, debe usarse un promotor activo en el músculo. Estos incluyen los promotores de genes que codifican la β -actina esquelética, la cadena ligera 2^a de la miosina, la distrofina, la creatina quinasa muscular, así como promotores musculares sintéticos con actividades superiores a las de los promotores de origen natural (véase Li y col., *Nat. Biotech.*, 17:241-245 (1999)). Se conocen ejemplos de
10 promotores que son específicos de tejido para hígado (albúmina, Miyatake y col., *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997); el promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig y col., *Gene Ther.*, 3:1002-9 (1996); alfa-fetoproteína (AFP), Arbutnot y col., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)), osteocalcina ósea (Stein y col., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)); sialoproteína ósea (Chen y col., *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64 (1996)), linfocitos (CD2, Hansal y col., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998); cadena pesada de la inmunoglobulina; cadena del receptor de linfocitos T),
15 neuronales tales como el promotor de la enolasa específica de neuronas (NSE) (Andersen y col., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)), gen de la cadena ligera del neurofilamento (Piccioli y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)), y el gen vgf específico de neuronas (Piccioli y col., *Neuron*, 15:373-84 (1995)), entre otros.

Opcionalmente, los vectores vehículos de transgenes que codifican productos inmunogénicos terapéuticamente
20 útiles también pueden incluir marcadores seleccionables o genes indicadores pueden incluir secuencias que codifican resistencia a geneticina, higromicina o a purimicina, entre otros. Dichos indicadores seleccionables o genes marcadores (situados preferentemente fuera del genoma viral para el empaquetamiento en una partícula viral) se pueden usar para señalar la presencia de los plásmidos en las células bacterianas, tales como resistencia a la ampicilina. Otros componentes del vector pueden incluir un origen de replicación. La selección de estos y otros
25 promotores y elementos vectoriales son convencionales y muchas de estas secuencias están disponibles [véase, por ejemplo, Sambrook y col., y las referencias citadas en el mismo].

Estos vectores se generan utilizando las técnicas y secuencias proporcionadas en el presente documento en combinación con técnicas conocidas por los expertos en la materia. Tales técnicas incluyen técnicas de clonación convencionales de ADNc tales como las descritas en los textos [Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY], el uso de secuencias de oligonucleótidos solapantes de los genomas de adenovirus, reacción en cadena de la polimerasa, y cualquier procedimiento adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada.

III. Producción del vector viral

En un ejemplo, los plásmidos adenovirales de simio (u otros vectores) se utilizan para producir vectores
35 adenovirales. En un ejemplo, los vectores adenovirales son partículas adenovirales que tienen una replicación defectuosa. En un ejemplo, las partículas adenovirales se convierten en defectuosas para la replicación mediante deleciones en los genes de E1a y / o E1b. Como alternativa, los adenovirus se convierten en defectuosos para la replicación por otros medios, opcionalmente al tiempo que conservan los genes E1a y / o E1b. Los vectores adenovirales pueden contener también otras mutaciones en el genoma adenoviral, por ejemplo, mutaciones sensibles a la temperatura o deleciones en otros genes. En otros ejemplos, es deseable retener una región intacta
40 de E1a y / o de en los vectores adenovirales. Tal región de E1 intacta puede estar situada en su localización nativa en el genoma adenoviral o estar en el sitio de una deleción en el genoma adenoviral natural (por ejemplo, en la región E3).

En la construcción de vectores de adenovirus de simio útiles para la liberación de un gen en la célula humana (o de otro mamífero), se puede usar una serie de secuencias de ácido nucleico de adenovirus en los vectores. Por
45 ejemplo, la totalidad o una porción del gen E3 temprano retardado de adenovirus se puede eliminar de la secuencia de adenovirus de simio que forma una parte del virus recombinante. Se cree que la función del E3 de simio es irrelevante para la función y la producción de la partícula de virus recombinante. Los vectores de adenovirus de simio se pueden construir también con una deleción de al menos la región ORF6 del gen E4 y, más deseablemente, debido a la redundancia en la función de esta región, toda la región E4. Todavía otro vector contiene una deleción en el gen E2a temprano retardado. También se pueden realizar deleciones en cualquiera de los genes tardíos L1 a L5
50 del genoma del adenovirus de simio. De un modo similar, las deleciones en los genes intermedios IX y IVa₂ pueden ser útiles para algunos fines. Se pueden efectuar otras deleciones en los otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Las deleciones tratadas anteriormente pueden usarse individualmente, es decir, una secuencia de adenovirus para su uso como se describe en el presente documento puede contener deleciones una sola región.
55 Como alternativa, las deleciones de genes completos o partes de los mismos eficaces para destruir su actividad biológica pueden usarse en cualquier combinación. Por ejemplo, en un vector de ejemplo, la secuencia de adenovirus puede tener deleciones de los genes E1 y el gen E4, o de los genes E1, E2a y E3, o de los genes E1 y E3, o de los genes E1, E2a y E4, con o sin deleción de E3, y así sucesivamente. Como se ha tratado anteriormente, dichas deleciones pueden usarse en combinación con otras mutaciones, tales como mutaciones de sensibilidad a la
60 temperatura, para lograr un resultado deseado.

Un vector adenoviral que carece de cualquier secuencia adenoviral esencial (por ejemplo, E1a, E1b, E2a, E2b, E4 ORF6, L1, L2, L3, L4 y L5)) puede cultivarse en presencia de los productos génicos adenovirales que faltan que se requieren para la infectividad viral y la propagación de una partícula adenoviral. Estas funciones auxiliares pueden proporcionarse mediante el cultivo del vector adenoviral en presencia de una o más construcciones auxiliares (por ejemplo, un plásmido o virus) o una célula huésped de empaquetamiento. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas para la preparación de un vector Ad humano "mínimo" en la solicitud de patente internacional WO96 / 13597, publicada el 9 de mayo de 1996.

1. Virus auxiliares

Por lo tanto, dependiendo del contenido del gen de adenovirus de simio de los vectores virales utilizados para portar el minigén, puede ser necesario un adenovirus ayudante o un fragmento de virus no replicante para proporcionar suficientes secuencias génicas de adenovirus de simio necesarias para producir una partícula viral recombinante infecciosa que contenga el minigén. Los virus auxiliares útiles contienen secuencias de genes de adenovirus seleccionadas que no están presentes en la construcción del vector de adenovirus y / o no son expresadas por la línea celular de empaquetamiento en el que se ha transfectado el vector. En un ejemplo, el virus auxiliar es defectuoso en la replicación y contiene diversos genes de adenovirus además de las secuencias descritas anteriormente. Tal virus auxiliar se utiliza deseablemente en combinación con una línea celular que expresa E1.

Los virus auxiliares también se pueden formar en los conjugados poli-catiónicos como se describe en Wu y col., J. Biol. Chem., 374:16985-16987 (1989); K. J. Fisher y J. M. Wilson, Biochem. J., 299:49 (1 de abril de 1994). Los virus auxiliares pueden contener opcionalmente un segundo minigén indicador. En la técnica se conoce una serie de tales genes indicadores. La presencia de un gen indicador en el virus auxiliar que es diferente del transgén en el vector de adenovirus permite controlar de forma independiente tanto el vector Ad como el virus auxiliar. Este segundo indicador se utiliza para permitir la separación entre el virus recombinante resultante y el virus auxiliar tras la purificación.

2. Líneas celulares de complementación

Para generar adenovirus recombinantes de simio (Ad) con delección de cualquiera de los genes descritos anteriormente, la función de la región del gen delecionado, si es esencial para la replicación y la infectividad del virus, debe proporcionarse al virus recombinante a través de un virus auxiliar o una línea celular, es decir, una línea celular de complementación o empaquetamiento. En muchas circunstancias, una línea celular que expresa el E1 humano puede usarse para transcomplementar el vector Ad de chimpancé. Esto es particularmente ventajoso porque, debido a la diversidad entre las secuencias de Ad de chimpancé divulgadas en el presente documento y las secuencias de AdE1 humano que se encuentran en las células de empaquetamiento actualmente disponibles, el uso de células que contienen E1 humanas actuales impide la generación de adenovirus competentes para la replicación durante la replicación y el procedimiento de producción. Sin embargo, en ciertas circunstancias, será deseable utilizar una línea celular que exprese los productos génicos de E1 para la producción de un adenovirus de simio con delección de E1. Tales líneas celulares se han descrito. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.083.716.

Si se desea, se pueden utilizar las secuencias proporcionadas en el presente documento para generar una línea celular o célula de empaquetamiento que exprese, como mínimo, el gen de adenovirus E1 de SAdV39 bajo el control transcripcional de un promotor para la expresión en una línea celular padre seleccionada. Los promotores inducibles o constitutivos se pueden usar para este fin. Ejemplos de tales promotores se describen con detalle en otra parte en esta memoria descriptiva. Se selecciona una célula progenitora para la generación de una nueva línea celular que expresa cualquier gen de SAdV39 deseado. Sin limitación, tal línea celular padre puede ser células HeLa [Nº de acceso en ATCC CCL 2], A549 [Nº de acceso en ATCC CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo, Detroit 510, CCL 72] y WI-38 [75] CCL, entre otras. Estas líneas celulares están todas disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas de células padre adecuadas pueden obtenerse de otras fuentes.

Tales líneas celulares que expresan E1 son útiles en la generación de vectores de adenovirus de simio recombinantes con delección de E1. Adicionalmente, o como alternativa, las líneas celulares que expresan uno o más productos génicos adenovirales de simio, por ejemplo, E1a, E1b, E2a, y / o E4 ORF6, se pueden construir usando esencialmente los mismos procedimientos que se usan en la generación de vectores virales de simio recombinantes. Tales líneas celulares pueden usarse para transcomplementar vectores de adenovirus con delección de los genes esenciales que codifican esos productos, o para proporcionar funciones auxiliares necesarias para el empaquetamiento de un virus dependiente de auxiliar (por ejemplo, virus adenoasociados). La preparación de una célula huésped implica técnicas tales como el ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen ADNc y clonación genómica, que son bien conocidos y se describen en Sambrook y col., citado anteriormente, el uso de secuencias de oligonucleótidos solapantes de los genomas de adenovirus, en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa, procedimientos sintéticos, y cualquier otro procedimiento adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada.

En todavía otra alternativa, los productos génicos adenovirales esenciales se proporcionan en trans mediante el vector adenoviral y / o virus auxiliar. En tal caso, se puede seleccionar una célula huésped adecuada de cualquier organismo biológico, incluyendo células procariotas (por ejemplo, bacterianas) y células eucariotas, incluidas células de insecto, células de levadura y células de mamíferos. Las células huésped particularmente deseables se seleccionan de cualquier especie de mamífero, incluyendo, sin limitaciones, células tales como células A549, WEHI, 3T3, 10T1 / 2, HEK 293 o PERC6 (de las que todas ellas expresan E1 adenoviral funcional) [Fallaux, FJ y col., (1998), Hum Gene Ther, 9:1909-1917], células Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2 y fibroblastos primarios, hepatocitos y mioblastos derivados de mamíferos, incluyendo seres humanos, monos, ratones, ratas, conejos y hámsteres. La selección de las especies de mamíferos que proporcionan las células no es una limitación de esta invención; ni es el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblastos, hepatocitos, células tumorales, etc.

3. Ensamblaje de partículas virales y transfección de una línea celular

Generalmente, cuando se proporciona el vector que comprende el minigén mediante transfección, el vector se libera en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg de ADN, y, preferentemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 1×10^4 células a aproximadamente 1×10^{13} células, y, preferentemente, de aproximadamente 10^5 células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN del vector y las células huésped se pueden ajustar teniendo en consideración factores tales como el vector seleccionado, el procedimiento de liberación y las células huésped seleccionadas.

El vector puede ser cualquier vector conocido en la técnica o divulgado anteriormente, incluyendo ADN desnudo, un plásmido, fago, transposón, cósmidos, episomas, virus, etc. La introducción en la célula huésped del vector se puede lograr por cualquier medio conocido en el técnica o como se ha divulgado anteriormente, incluidas transfección e infección. Uno o más de los genes adenovirales puede estar integrado de forma estable en el genoma de la célula huésped, expresarse de forma estable como episomas, o expresarse de forma transitoria. Los productos génicos pueden expresarse todos transitoriamente sobre un episoma o integrarse de forma estable, o algunos de los productos génicos pueden expresarse de forma estable mientras que otros se expresan transitoriamente. Además, los promotores para cada uno de los genes adenovirales pueden seleccionarse independientemente a partir de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenoviral natural. Los promotores pueden estar regulados por un estado fisiológico específico del organismo o célula (es decir, por el estado de diferenciación o en células en replicación o quiescentes) o por factores añadidos exógenamente, por ejemplo.

La introducción de las moléculas (como plásmidos o virus) en la célula huésped también puede realizarse utilizando técnicas conocidas por el experto en la materia y como se trata a lo largo de la memoria descriptiva. En ejemplos preferentes, se usan técnicas de transfección estándar, por ejemplo, transfección en CaPO_4 o electroporación.

El ensamblaje de las secuencias de ADN seleccionadas del adenovirus (así como el transgén u otros elementos de del vector en diversos plásmidos intermedios, y el uso de los plásmidos y vectores para producir una partícula viral recombinante se consiguen usando técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen técnicas de clonación convencionales de ADNc tales como las descritas en los textos [Sambrook y col., citado anteriormente], el uso de secuencias de oligonucleótidos solapantes de los genomas de adenovirus, reacción en cadena de la polimerasa, y cualquier procedimiento adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada. Se usan técnicas de transfección y cotransfección estándar, por ejemplo, técnicas de precipitación en CaPO_4 . Otros procedimientos convencionales empleados incluyen recombinación homóloga de los genomas virales, formación de placas de virus en capa de agar, procedimientos de medición de la generación de señal, y similares.

Por ejemplo, tras la construcción y ensamblaje del vector viral que contiene el minigén deseado, el vector se transfecta *in vitro* en presencia de un virus auxiliar en la línea celular de empaquetamiento. Se produce recombinación homóloga entre las secuencias del auxiliar y del vector, lo que permite que las secuencias del transgén del adenovirus en el vector se repliquen y se empaqueten en cápsides del virión, lo que da como resultado partículas de vectores virales recombinantes. El procedimiento actual para producir tales partículas de virus se basa en la transfección. No obstante, la invención no se limita a estos procedimientos.

Los adenovirus de simio recombinantes resultantes son útiles en la transferencia de un transgén seleccionado a una célula seleccionada. Los experimentos *in vivo* con el virus recombinante cultivado en las líneas celulares de empaquetamiento, los vectores adenovirales de simio recombinantes con delección de E1 demuestran utilidad en la transferencia de un transgén a una célula no perteneciente a un simio, preferentemente de ser humano.

IV. Uso de vectores de adenovirus recombinantes

Los vectores basados en adenovirus -39, SAAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 de simio recombinantes son útiles para la transferencia génica a un paciente humano o veterinario no simio *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Los vectores de adenovirus recombinantes descritos en el presente documento pueden usarse como vectores de expresión para la producción de los productos codificados por los genes heterólogos *in vitro*. Por ejemplo, los adenovirus recombinantes que contienen un gen insertado en la ubicación de una delección de E1 se pueden transfectar en una línea celular que expresa E1 como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los adenovirus competentes para la replicación se pueden utilizar en otra línea celular seleccionada. Después, las células

transfectadas se cultivan de la manera convencional, lo que permitiendo que el adenovirus recombinante exprese el producto génico a partir del promotor. Después, el producto génico puede recuperarse del medio de cultivo por procedimientos convencionales conocidos de aislamiento y recuperación de proteínas a partir del cultivo.

5 Un vector adenoviral recombinante de simio derivado de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 proporciona un vehículo de transferencia génica eficaz que puede liberar un transgén seleccionado a una célula huésped seleccionada in vivo o ex vivo aun cuando el organismo tenga anticuerpos neutralizantes frente a uno o más serotipos de AAV. En un ejemplo, el rAAV y las células se mezclan *ex vivo*; las células infectadas se cultivan usando metodologías convencionales; y las células transducidas se vuelven a infundir en el paciente. Estas composiciones son particularmente adecuadas para la administración de genes con fines terapéuticos y para la inmunización, incluyendo la inducción de inmunidad protectora.

10 Más habitualmente, los vectores adenovirales recombinantes de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se utilizarán para la liberación de moléculas terapéuticas o inmunogénicas, como se describe a continuación. Se entenderá fácilmente para ambas aplicaciones que los vectores adenovirales recombinantes divulgados en el presente documento son particularmente adecuados para su uso en regímenes que implican la liberación repetida de vectores adenovirales recombinantes. Tales regímenes implican típicamente la liberación de una serie de vectores virales en los que se alternan las cápsides virales. Los cápsides virales pueden ser cambiarse para cada administración posterior o después de un número preseleccionado de administraciones de una cápside de un serotipo particular (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más). Por lo tanto, un régimen puede implicar la liberación de un rAd con una primera cápside de simio, la liberación con un rAd con una segunda cápside de simio, y la liberación con una tercera cápside de simio. Otros diversos regímenes que utilizan las cápsides de Ad divulgadas en el presente documento, en combinación unos con otros, o en combinación con otros adenovirus (que preferentemente no producen reacciones cruzadas inmunológicamente) serán evidentes para los expertos en la técnica. Opcionalmente, tal régimen puede implicar la administración de rAd con cápsides de otros adenovirus de primate no humano, adenovirus humanos o secuencias artificiales como las que se describen en el presente documento. Cada fase del régimen puede implicar la administración de una serie de inyecciones (u otras vías de administración) con una única cápside de Ad seguida de una serie con otra cápside de una fuente diferente de Ad. Como alternativa, los vectores de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden usarse en regímenes que implican otros sistemas de liberación no mediada por adenovirus, incluyendo otros sistemas virales, sistemas de liberación no virales, proteínas, péptidos, y otras moléculas biológicamente activas.

20 Las secciones siguientes se centrarán en moléculas de ejemplo que se pueden suministrar a través de los vectores divulgados en el presente documento.

A. Liberación mediada por Ad de moléculas terapéuticas

25 En un ejemplo, los vectores recombinantes descritos anteriormente se administran a los seres humanos de acuerdo con los procedimientos publicados para la terapia génica. Un vector viral de simio portador del transgén seleccionado puede administrarse a un paciente, preferentemente suspendido en una solución biológicamente compatible o vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Un vehículo adecuado incluye solución salina estéril. Para este fin se pueden usar otras soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que se sabe que son vehículos farmacéuticamente aceptables y bien conocidos por los expertos en la técnica.

30 Los vectores adenovirales de simio se administran en cantidades suficientes para transducir las células diana y proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión génica para proporcionar un beneficio terapéutico sin efectos fisiológicos adversos indebidos o médicamente aceptables, que los expertos en las técnicas médicas pueden determinar. Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, la liberación directa en la retina y otros procedimientos de liberación intraocular, liberación directa en el hígado, inhalación, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, rectal, vías y otras vías de administración parenteral. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea, o ajustarse dependiendo del transgén o de la afección. La vía de administración dependerá principalmente de la naturaleza de la afección a tratar.

35 Las dosificaciones del vector viral dependerán principalmente de factores tales como la afección a tratar, la edad, el peso y la salud del paciente, y, por lo tanto, pueden variar entre pacientes. Por ejemplo, una dosis veterinaria o humana para adulto terapéuticamente eficaz del vector viral está generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 100 ml de un vehículo que contiene concentraciones de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{15} partículas, de aproximadamente 1×10^{11} a 1×10^{13} partículas o de aproximadamente 1×10^9 a 1×10^{12} partículas de virus. Las dosificaciones variarán dependiendo del tamaño del animal y de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis veterinaria o humana adecuada (para un animal de aproximadamente 80 kg) para la inyección intramuscular se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 5×10^{12} partículas por ml, para un único sitio. Opcionalmente, se pueden liberar en múltiples sitios de administración. En otro ejemplo, una dosificación humana o veterinaria adecuada puede estar en el intervalo de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{15} partículas para una formulación oral. Un experto en la técnica puede ajustar estas dosis, dependiendo de la vía de administración y la aplicación terapéutica o de vacuna para la que se emplea el

vector recombinante. Los niveles de expresión del transgén, o para un inmunógeno, el nivel de anticuerpos circulantes, pueden controlarse para determinar la frecuencia de administración de la dosificación. Sin embargo, otros procedimientos para determinar la cronología de la frecuencia de administración serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

- 5 Una etapa del procedimiento opcional implica la coadministración al paciente, ya sea simultáneamente o antes o después de la administración del vector viral, de una cantidad adecuada de un modulador inmunitario de acción corta. El modulador inmunitario seleccionado se define aquí como un agente capaz de inhibir la formación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el vector recombinante divulgado en el presente documento o capaz de inhibir la eliminación de los linfocitos T citolítico (CTL) del vector. El modulador inmunitario puede interferir con las interacciones entre las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores (T_{H1} o T_{H2}) y linfocitos B para inhibir la formación de anticuerpos neutralizantes. Como alternativa, el modulador inmunitario puede inhibir la interacción entre las células T_{H1} y los CTL para reducir la aparición de eliminación de CTL del vector. Se divulgan varios moduladores inmunitarios útiles y dosificaciones para el uso de los mismos, por ejemplo en Yang y col., J. Virol, 70 (9) (Sept., 1996)..; solicitud de patente Internacional N° WO96 / 12406, publicada el 2 de mayo de 1996; y solicitud de patente internacional n° PCT / US96 / 03035.

1. Transgenes terapéuticos

Productos terapéuticos útiles codificados por el transgén incluyen hormonas y factores de crecimiento y diferenciación, incluyendo, sin limitaciones, insulina, glucagón, hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de la hormona de crecimiento (GRF), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor transformante de crecimiento (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), cualquiera de la superfamilia del factor de crecimiento transformante, incluyendo TGF, activinas, inhibinas, o cualquiera de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) BMP 1-15, una cualquiera de la familia de diferenciación de heregluina/neu-regulina/ARIA/ neu (NDF) de factores de crecimiento, factor de crecimiento neural (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF), neurturina, agrina, uno cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, noggin, sonic hedgehog y tirosina hidroxilasa.

Otros productos transgénicos útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario, incluyendo, sin limitación, citocinas y linfocinas tales como trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-25 (incluyendo, por ejemplo, IL-2, IL-4, factor de células IL-12 e IL-18), proteína quimiotáctica de monocitos, factor inhibidor de leucemia, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral e interferones, y, factor de células madres, ligando flk-2 / flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T quiméricos, receptores de linfocitos T de cadena única, moléculas del MHC de clase I y clase II, así como inmunoglobulinas y moléculas MHC modificadas por ingeniería. Los productos génicos útiles incluyen también proteínas reguladoras del complemento, tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína cofactor de membrana (MCP), factor acelerador del deterioro (DAF), CR1, CF2 y CD59.

Todavía otros productos génicos útiles incluyen uno cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La divulgación abarca receptores para la regulación del colesterol, incluyendo el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el receptor de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), el receptor de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y el receptor de secuestrantes. La divulgación también abarca productos génicos tales como los miembros de la superfamilia del receptor de hormona esteroideas, incluyendo los receptores de glucocorticoides y los receptores de estrógenos, los receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Además, los productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tales como *jun*, *fos*, *max*, *mad*, factor de respuesta sérica (SRF), AP-1, AP2, *myb*, MyoD y miogenina, proteínas que contienen la caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas que contienen la caja CCAAT, interferón factor de regulación (IRF-1), proteína del tumor de Wilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a la caja GATA, por ejemplo, GATA-3, y la familia forkhead de las proteínas de la hélice con alas.

Otros productos génicos útiles incluyen, carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, argininosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, factor VIII, factor IX, cistationina beta-sintasa, cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, CoA carboxilasa propionilo, tase-mu malonil CoA metilo, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, beta-glucosidasa, carboxilato piruvato, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y una secuencia de ADNc de la distrofina.

Otros productos génicos útiles incluyen polipéptidos de origen no natural, tales como polipéptidos quiméricos o híbridos que tienen una secuencia de aminoácidos de origen no natural que contiene inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de cadena única modificadas por ingeniería podrían ser útiles en ciertos pacientes inmunocomprometidos. Otros tipos de secuencias génicas de origen no natural incluyen moléculas antisentido y ácidos nucleicos catalíticos, tales como ribozimas, que podrían usarse para reducir la sobreexpresión de un objetivo.

La reducción y / o modulación de la expresión de un gen son particularmente deseables para el tratamiento de afecciones hiperproliferativas caracterizadas por células hiperproliferantes, como son los cánceres y la psoriasis. Los polipéptidos diana incluyen aquellos polipéptidos que se producen exclusivamente o a niveles más altos en las células hiperproliferativas en comparación con las células normales. Los antígenos objetivo incluyen polipéptidos codificados por oncogenes tales como myb, myc, fyn, y el gen de translocación bcr / abl, ras, src, P53, neu, trk y EGRF. Además de los productos de oncogenes como antígenos diana, los polipéptidos objetivo para tratamientos anticancerosos y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos producidos por linfomas de células B y regiones variables de receptores de linfocitos T de linfomas de linfocitos T que, en algunos ejemplos, también se utilizan como antígenos diana para la enfermedad autoinmune. Otros polipéptidos asociados a tumores pueden usarse como polipéptidos objetivo, tales como polipéptidos que se encuentran a niveles más altos en las células tumorales, incluyendo el polipéptido reconocido por el anticuerpo monoclonal 17-1A y los polipéptidos de unión a folato.

Otros polipéptidos y proteínas terapéuticos adecuados incluyen aquellos que pueden ser útiles para el tratamiento de individuos que sufren enfermedades y trastornos autoinmunes al conferir una respuesta inmunitaria protectora amplia contra objetivos que están asociados con la autoinmunidad, incluyendo receptores celulares y células que producen anticuerpos autodirigidos. Las enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T incluyen artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), síndrome de Sjögren, sarcoidosis, diabetes mellitus dependiente de insulina (DMDI), tiroiditis autoinmune, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por receptores de células T (TCR) que se unen a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con las enfermedades autoinmunes.

Los vectores adenovirales de simio divulgados en el presente documento son particularmente adecuados para regímenes terapéuticos en los que se desean múltiples liberaciones de transgenes mediadas por adenovirus, por ejemplo, en los regímenes que implican la liberación repetida del mismo transgén o en regímenes de combinación que implica la liberación de otros transgenes. Tales regímenes pueden implicar la administración de un vector de adenovirus de simio de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38, seguida de la readministración con un vector del adenovirus del mismo serotipo. Regímenes particularmente deseables implican la administración de un vector adenoviral de simio de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 en el que la fuente de las secuencias de la cápside adenoviral del vector liberado en la primera administración se diferencia de la fuente de las secuencias de la cápside adenoviral del vector viral utilizado en una o más de las administraciones posteriores. Por ejemplo, un régimen terapéutico implica la administración de un vector de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 y repetir la administración con uno o más vectores adenovirales de los mismos o diferentes serotipos. En otro ejemplo, un régimen terapéutico implica la administración de un vector adenoviral seguido de la administración repetida con vector de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 que tiene una cápside que difiere de la fuente de la cápside en el primer vector adenoviral liberado, y opcionalmente, además la administración con otro vector que es el mismo o, preferentemente, difiere de la fuente de la cápside adenoviral del vector en las etapas de administración previa. Estos regímenes no están limitados a la liberación de vectores adenovirales construidos utilizando las secuencias de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 de simio. Por el contrario, estos regímenes pueden utilizar fácilmente otras secuencias adenovirales, incluyendo, sin limitación, otras secuencias adenovirales de simio, (por ejemplo, Pan9 o C68, C1, etc.), otras secuencias adenovirales de primates no humanos, o secuencias adenovirales humanas, en combinación con uno o más de los vectores de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38. Ejemplos de tales serotipos adenovirales de simio, humanos o de otros primates no humanos se tratan en otra parte de este documento. Además, estos regímenes terapéuticos pueden implicar la liberación simultánea o secuencial de vectores adenovirales de SAdV39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 en combinación con vectores no adenovirales, vectores no virales, y / o una diversos otros compuestos o moléculas terapéuticamente útiles. La invención no está limitada a estos regímenes terapéuticos, cuya diversidad será fácilmente evidente para un experto en la materia.

B. Liberación de transgenes inmunogénicos mediada por Ad

Los vectores recombinantes de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden usarse también como composiciones inmunogénicas. Como se usa en el presente documento, una composición inmunogénica es una composición frente a la que se monta una respuesta humoral (por ejemplo, de anticuerpos) o celular (por ejemplo, de linfocitos T citotóxicos) frente a un producto transgénico liberado por la composición inmunogénica después de la administración a un mamífero, y preferentemente a un primate. Un Ad de simio recombinante puede contener en cualquiera de sus secuencias de adenovirus deleciones de un gen que codifica un inmunógeno deseado. Es probable que el adenovirus de simio sea más adecuado para su uso como una vacuna de virus recombinante vivo en diferentes especies animales en comparación con un adenovirus de origen humano, pero no está limitado a tal

uso. Los adenovirus recombinantes pueden usarse como vacunas profilácticas o terapéuticas contra cualquier patógeno para el que se ha identificado el o los antígeno (s) cruciales para la inducción de una respuesta inmunitaria y capaces de limitar la propagación del patógeno y para el cual se dispone del ADNc.

5 Dichas composiciones de vacuna (u otras inmunogénicas) se formulan en un vehículo de administración adecuado, como se ha descrito anteriormente. Generalmente, las dosis para las composiciones inmunogénicas están en el intervalo definido anteriormente para composiciones terapéuticas. Los niveles de inmunidad del gen seleccionado pueden controlarse para determinar la necesidad, si la hay, de refuerzos. Tras una evaluación de los títulos de anticuerpos en el suero, pueden desearse inmunizaciones de refuerzo opcionales.

10 Opcionalmente, una composición de vacuna como se divulga en el presente documento se puede formular para que contengan otros componentes, incluyendo, por ejemplo, adyuvantes, estabilizadores, ajustadores de pH, conservantes y similares. Tales componentes son bien conocidos por los expertos en la técnica de las vacunas. Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, sin limitación, liposomas, alumbre, monofosforilo lípido A, y cualquier factor biológicamente activo, tal como citocina, una interleucina, una quimiocina, un ligando y, óptimamente, combinaciones de las mismas. Algunos de estos factores biológicamente activos pueden expresarse in vivo, por
15 ejemplo, a través de un plásmido o vector viral. Por ejemplo, dicho adyuvante puede administrarse con una vacuna de ADN de sensibilización que codifica un antígeno para potenciar la respuesta inmune específica de antígeno en comparación con la respuesta inmune generada tras la sensibilización con una vacuna de ADN que codifica solo el antígeno.

20 Los adenovirus recombinantes se administran en una "una cantidad inmunogénica", es decir, una cantidad de adenovirus recombinantes que es eficaz en una vía de administración para transfectar las células deseadas y proporcionar niveles suficientes de expresión del gen seleccionado para inducir una respuesta inmunitaria. Cuando se proporciona inmunidad protectora, los adenovirus recombinantes se considera que son composiciones de vacuna útiles en la prevención de la infección y / o enfermedad recurrente.

25 Alternativamente, o adicionalmente, los vectores pueden contener un transgén que codifica un péptido, polipéptido o proteína que induce una respuesta inmune a un inmunógeno seleccionado. Cabe esperar que los vectores recombinantes de SAdV descritos en el presente documento sean altamente eficaces en la inducción de linfocitos T citotóxicos y anticuerpos frente a la proteína antigénica heteróloga insertada expresada por el vector.

30 Por ejemplo, los inmunógenos se pueden seleccionar de una variedad de familias virales. Ejemplo de familias virales contra las que una respuesta inmune sería deseable incluyen, la familia de los picornavirus, que incluye los géneros de rinovirus, que son responsables de aproximadamente el 50 % de los casos de resfriado común; los géneros de enterovirus, que incluyen poliovirus, virus coxsackie, echovirus y enterovirus humanos tales como el virus de la hepatitis A; y los géneros de aptovirus, que son responsables de enfermedades de los pies y la boca, principalmente en animales no humanos. Dentro de la familia de virus de picornavirus, los antígenos objetivo incluyen VP1, VP2, VP3, VP4 y VPG. Otra familia viral incluye la familia de calcivirus, la cual abarca el grupo de virus Norwalk, que son
35 un importante agente causal de gastroenteritis epidémica. Todavía otra familia viral deseable para su uso en la selección de antígenos para inducir respuestas inmunitarias en humanos y animales no humanos es la familia de los togavirus, la cual incluye los géneros de alfavirus géneros, que incluyen los virus Sindbis, el virus RossRiver, y los virus de la encefalitis equina oriental y occidental de Venezuela, y rubivirus, incluido el virus de la rubéola. La familia Flaviviridae incluye los virus del dengue, la fiebre amarilla, la encefalitis japonesa, la encefalitis de San Luis y de la encefalitis transmitida por garrapatas. Otros antígenos objetivo pueden generarse a partir de la familia del virus de la hepatitis C o de la familia de los coronavirus, que incluye un número de virus no humanos tales como el virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral), el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (cerdos), el virus de la encefalomielitis hemaglutinante porcina (cerdos), el virus de la peritonitis infecciosa felina (gatos), el coronavirus entérico felino (gatos), el coronavirus canino (perro), y los coronavirus respiratorios humanos, que pueden causar el
40 resfriado común y / o la hepatitis no-A, B o C. Dentro de la familia de coronavirus, los antígenos objetivo incluyen la glicoproteína E1 (también llamada proteína M o de la matriz), E2 (también llamada proteína S o Spike), E3 (también llamada HE o hemaglutinina-elterosa) (no presente en todos los coronavirus), o N (nucleocápside). Aún otros antígenos pueden dirigirse contra la familia de rhabdovirus, la cual incluye los géneros vesiculovirus (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular), y el lisavirus general (por ejemplo, la rabia).

50 Dentro de la familia rde abdo virus, los antígenos adecuados pueden derivar de la proteína G o la proteína N. La familia filoviridae, que incluye los virus de la fiebre hemorrágica, tal como el virus de Marburg y de Ébola, puede ser una fuente adecuada de antígenos. La familia de paramixovirus incluye los virus de parainfluenza de tipo 1, de parainfluenza de tipo 3, de parainfluenza bovina de tipo 3, rubulavirus (virus de las paperas, de parainfluenza de tipo 2, de parainfluenza de tipo 4, el virus de la enfermedad de Newcastle (pollos), la peste bovina, el morbilivirus, que
55 incluye los virus del sarampión y el moquillo canino, y neumovirus, que incluye el virus sincitial respiratorio. El virus de la gripe se clasifica dentro de la familia de los ortomixovirus familia y es una fuente adecuada de antígeno (por ejemplo, la proteína HA, la proteína N1). La familia bunyavirus incluye los géneros bunyavirus (encefalitis de California, La Crosse), flebovirus (fiebre del Valle del Rift), hantavirus (puremala es un virus de la fiebre hemahagina), Nairovirus (enfermedad ovina de Nairobi) y varios bungavirus sin asignar. La familia de arenavirus proporciona una fuente de antígenos contra LCM y el virus de la fiebre de Lassa. La familia reovirus incluye los
60 géneros de el reovirus, rotavirus (que causa la gastroenteritis aguda en niños), orbivirus y cultivirus (fiebre de la

garrapata de Colorado, Lebombo (seres humanos), encefalosis equina, lengua azul).

La familia de retrovirus incluye la subfamilia oncorivirinal que abarca enfermedades humanas y veterinarias tales como el virus de la leucemia felina, HTLVI y HTLVII, lentivirinal (que incluye el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la anemia infecciosa equina, y spuma virinal). Entre los lentivirus, se han descrito muchos antígenos adecuados y pueden seleccionarse fácilmente. Ejemplos de antígenos adecuados contra el VIH y el VIS incluyen, sin limitación, las proteínas gag, pol, Vif, Vpx, VPR, Env, Tat, Nef, y Rev, así como diversos fragmentos de las mismas. Por ejemplo, los fragmentos adecuados de la proteína Env pueden incluir cualquiera de sus subunidades tales como gp120, gp160, gp41 o fragmentos más pequeños de las mismas, por ejemplo, de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud. Del mismo modo, se pueden seleccionar fragmentos de la proteína tat. [Véase, la patente de EE.UU. 5.891.994 y la patente de EE.UU. 6.193.981.] Véanse, también, las proteínas del VIH y el VIS descritas en D.H. Barouch y col., J. Virol., 75(5):2462-2467 (marzo de 2001), y R.R. Amara, y col., Science, 292:69-74 (6 de abril de 2001). En otro ejemplo, las proteínas o péptidos inmunogénicos del VIH y / o VIS pueden usarse para formar proteínas de fusión u otras moléculas inmunogénicas. Véase, por ejemplo, las proteínas de fusión del VIH -Tat y/o Nef y los regímenes de inmunización descritos en el documento WO 01/54719, publicado el 2 de agosto de 2001, y el documento WO 99/16884, publicado el 8 de abril de 1999. La invención no está limitada a las proteínas y péptidos inmunogénicos del VIH y/o el VIS descritos en el presente documento. Además, se han descrito diversas modificaciones de estas proteínas o podrían ser fabricadas fácilmente por un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, la proteína gag modificada que se describe en la patente US 5.972.596. Además, cualquier inmunógeno del VIH y / o VIS deseado se puede liberar solo o en combinación. Tales combinaciones pueden incluir expresión a partir de un único vector o de múltiples vectores. Opcionalmente, otra combinación puede implicar la liberación de uno o más inmunógenos expresados con la liberación de uno o más de los inmunógenos en forma de proteína. Dichas combinaciones se tratarán más detalladamente más adelante.

La familia de papovavirus incluye la subfamilia de poliomavirus (virus BKU y JCU) y la subfamilia del virus del papiloma (asociados con cánceres o la progresión maligna del papiloma). La familia de adenovirus incluye virus (EX, AD7, ARD, OB) que causan enfermedades respiratorias y / o enteritis. La familia de parvovirus, el parvovirus felino (enteritis felina), el panleucopeniavirus felino, el parvovirus canino y el parvovirus porcino. La familia de los herpesvirus incluye la subfamilia de alphaherpesvirinae, que abarca los géneros del virus simple (HSVI, HSVII), varicellovirus (seudorabia, varicela zoster) y la subfamilia de betaherpesvirinae, que incluye el los géneros del citomegalovirus (HCMV, muromegalovirus) y la subfamilia de gammaherpesvirinae, que incluye los géneros del linfocriptovirus, EBV (linfoma de Burkitt), rinotraqueitis infecciosa, el virus de la enfermedad de Marek, y rhadinovirus. La familia de poxvirus incluye la subfamilia de cordopoxvirinae, que abarca los géneros de ortopoxvirus (viruela (viruela) y vacunal (viruela bovina)), parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus y la subfamilia de entomopoxvirinae. La familia de hepadnavirus incluye el virus de la hepatitis B. Un virus sin clasificar que puede ser fuente adecuada de antígenos es el virus de la hepatitis delta. Sin embargo otras fuentes virales pueden incluir virus de enfermedad de bursitis infecciosa aviar y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. La familia de alfavirus incluye el virus de la arteritis equina y varios virus de encefalitis.

Los inmunógenos que son útiles para inmunizar a un ser humano o animal no humano frente a otros patógenos incluyen, por ejemplo, bacterias, hongos, microorganismos parásitos o parásitos multicelulares, que infectan a vertebrados no humanos y humanos, o de una célula cancerosa o célula tumoral. Ejemplos de patógenos bacterianos incluyen cocos patogénicos grampositivos, incluidos neumococos; estafilococos; y estreptococos. Los cocos patogénicos gramnegativos incluyen meningococos; gonococos. Los bacilos gramnegativos entéricos patogénicos incluyen enterobacterias; pseudomonas, acinetobacterias y eikenella; melioidosis; salmonella; shigella; haemophilus; moraxella; *H. ducreyi* (que causa el cancro); brucella; *Francisella tularensis* (que causa la tularemia); yersinia (pasteurella); estreptobacillus moniliformis y spirillum; los bacilos grampositivos incluyen listeria monocytogenes; erysipelothrix rhusiopathiae; *Corynebacterium diphtheria* (difteria); cólera; *B. anthracis* (ántrax); donovanosis (granuloma inguinal); y bartonelosis. Las enfermedades causadas por bacterias anaerobias patógenas incluyen tétanos; botulismo; otros clostridios; tuberculosis; lepra; y otras micobacterias. Enfermedades por espiroquetas patogénicas incluyen sífilis; treponematosis: frambesía, pinta y sífilis endémica; y leptoespirosis. Otras infecciones causadas por bacterias patógenas superiores y hongos patógenos incluyen actinomicosis; nocardiosis; criptococosis, blastomicosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis; candidiasis, aspergilosis y mucormicosis; esporotricosis; paracoccidioidomicosis, petriellidiosis, toruloposis, micetoma y cromomicosis; y dermatofitosis. Las infecciones por rickettsias incluyen la fiebre del tifus, la fiebre manchada de las Montañas Rocosas y la rickettsiosis. Los ejemplos de infecciones por micoplasmas y clamidias incluyen: mycoplasma pneumoniae; lymphogranuloma venereum; psittacosis; e infecciones por clamidias perinatales. Eucariotas patógenas abarcan protozoos y helmintos patógenos y las infecciones producidas de esta manera incluyen: amebiasis; malaria; leishmaniasis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; babesiosis; giardiasis; triquinosis; filariasis; esquistosomiasis; nematodos; trematodos o flukes; e infecciones producidas por cestodos (tenia).

Muchos de estos organismos y / o toxinas producidas, por tanto, han sido identificados por los Centros para el Control de Enfermedades [(CDC), Departamento de Salud y Servicios Humanos, EE.UU.], como agentes que tienen potencial para su uso en ataques biológicos. Por ejemplo, algunos de estos agentes biológicos, incluyen, Bacillus anthracis (ántrax), Clostridium botulinum y su toxina (botulismo), *Yersinia pestis* (peste), variola mayor (viruela), *Francisella tularensis* (tularemia), y fiebres hemorrágicas virales [filoviruses (por ejemplo, Ébola, Marburg), y

arenaviruses [por ejemplo, Lassa, Machupo]), todos los cuales están clasificados actualmente como agentes de la categoría A; *Coxiella burnetti* (fiebre Q); especies de *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (meloidosis), *Ricinus communis* y su toxina (la toxina ricina), *Clostridium perfringens* y su toxina (toxina epsilon), especies de *Staphylococcus* y sus toxinas (enterotoxinas B), *Chlamydia psittaci* (psitacosis),
 5 amenazas a la seguridad del agua (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*), fiebre del tifus (*Richettsia powazekii*), y encefalitis viral (alfaviruses, por ejemplo, encefalitis equina venezolana; encefalitis equina oriental; encefalitis equina occidental); todos los cuales están clasificados actualmente como agentes de categoría B; y el virus Nipán y los hantavirus, que se clasifican actualmente como agentes de categoría C. Además, otros
 10 organismos, que se clasifican así o de manera diferente, se pueden identificar y / o utilizar para tal fin en el futuro. Se comprenderá fácilmente que los vectores virales y otras construcciones aquí descritas son útiles para liberar antígenos de estos organismos, virus, sus toxinas u otros subproductos, que prevendrán y/o tratarán la infección u otras reacciones adversas con estos agentes biológicos.

Se prevé que la administración de los vectores de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 libera inmunógenos contra la región variable de las células T provoque una respuesta inmune que incluye CTL para eliminar dichas
 15 células T. En la AR, se han caracterizado varias regiones variables específicas de los TCR que están implicados en la enfermedad. Estos TCR incluyen V-3, V-14, V-17 y V α -17. Por lo tanto, la liberación de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de estos polipéptidos provocará una respuesta inmunitaria que tendrá como objetivo las células T involucradas en la AR. En la EM, se han caracterizado varias regiones variables específicas de los TCR que están implicados en la enfermedad. Estos TCR incluyen V-7 Y V α -10. Por lo tanto, la liberación de una
 20 secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de estos polipéptidos provocará una respuesta inmunitaria que tendrá como objetivo las células T involucradas en la EM. En la esclerodermia se han caracterizado varias regiones variables específicas de los TCR que están implicados en la enfermedad. Estos TCR incluyen V-6, V-8, V-14 y V α -16, V α -3C, V α -7, V α -14, V α -15, V α -16, V α -28 y V α -12.. Por lo tanto, la liberación de adenovirus recombinante de simio que codifica al menos uno de estos polipéptidos provocará una respuesta inmunitaria que
 25 tendrá como objetivo las células T involucradas en la esclerodermia.

C. Procedimientos de liberación mediada por Ad

Los niveles terapéuticos, o niveles de inmunidad del gen seleccionado pueden controlarse para determinar la necesidad, si la hay, de refuerzos. Tras una evaluación de la respuesta de células T CD8 +, u opcionalmente, los
 30 títulos de anticuerpo, en el suero, puede ser deseable realizar inmunizaciones de refuerzo opcionales. Opcionalmente, los vectores recombinantes de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 pueden liberarse una única administración o en varios regímenes de combinación, por ejemplo, en combinación con un régimen o curso de tratamiento que implique a otros ingredientes activos o en un régimen de sensibilización-refuerzo. Varios de tales regímenes se han descrito en la materia y puede seleccionarse fácilmente.

Por ejemplo, los regímenes de sensibilización-refuerzo pueden implicar la administración de un vector basado en ADN (por ejemplo, plásmido) para sensibilizar el sistema inmune frente a la segunda administración de refuerzo con un antígeno tradicional, tal como una proteína o un virus recombinante portador de las secuencias que codifican
 35 tales un antígeno. Véase, por ejemplo, el documento WO 00/11140, publicado el 2 de marzo de 2000. Como alternativa, un régimen de inmunización puede implicar la administración de un vector recombinante de SAdV-39, SAdV-25.2, -30, -37 o -38 para reforzar la respuesta inmune a un vector (ya sea viral o basado en ADN) portador de un antígeno, o una proteína. En aún otra alternativa, un régimen de inmunización implica la administración de una proteína seguida de refuerzo con un vector que codifica el antígeno.

En un ejemplo, se describe un procedimiento de sensibilización y refuerzo de una respuesta inmune frente a un antígeno seleccionado mediante la liberación de un vector plasmídico de ADN portador de dicho antígeno, seguido de refuerzo con un vector recombinante de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38. En un ejemplo, el régimen
 45 de sensibilización-refuerzo implica la expresión de multiproteínas desde el vehículo de sensibilización y / o refuerzo. Véase, por ejemplo, R.R. Amara, Science, 292:69-74 (6 de abril de 2001) que describe un régimen de multiproteínas para la expresión de subunidades de proteína útiles para generar una respuesta inmune contra el VIH y el VIS. Por ejemplo, una sensibilización de ADN puede liberar Gag, Pol, Vif, VPX y Vpr y Env, Tat y Rev a partir de un único transcrito. Alternativamente, las proteínas Gag, Pol del VIS y Env del VIH-1 se liberan en una construcción de
 50 adenovirus de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38. Otros regímenes más se describen en los documentos WO 99/16884 y WO 01/54719.

Sin embargo, los regímenes de sensibilización-refuerzo no se limitan a la inmunización para el VIH o la liberación de estos antígenos. Por ejemplo, la sensibilización puede implicar liberar con un primer vector de SAdV-39, SAdV-
 55 25.2, -26, -30, -37 o -38 seguido de refuerzo con un segundo vector Ad, o con una composición que contiene el propio antígeno en forma de proteína. En un ejemplo, el régimen de sensibilización-refuerzo no puede proporcionar una respuesta inmune protectora a los virus, bacterias u otro organismo del que deriva el antígeno. En otro ejemplo, el régimen de sensibilización-refuerzo proporciona un efecto terapéutico que puede medirse utilizando ensayos consenso para la detección de la presencia de la afección para la cual se está administrando la terapia.

La composición de sensibilización puede administrarse en varios sitios en el cuerpo de una manera dependiente de
 60 la dosis, que depende del antígeno al que se está dirigiendo la respuesta inmune deseada. La cantidad o el sitio del

o las inyecciones o el vehículo farmacéutico no es una limitación. Por el contrario, el régimen puede implicar una etapa de sensibilización y/o refuerzo, cada uno de las cuales puede incluir una dosis única o dosis que se administran cada hora, diariamente, semanalmente o mensualmente o anualmente. Como ejemplo, los mamíferos pueden recibir una o dos dosis que contengan entre aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de plásmido en el vehículo. Una cantidad deseable de una composición de ADN varía entre aproximadamente 1 µg a aproximadamente 10.000 µg del vector de ADN. Las dosis pueden variar de aproximadamente 1 µg a 1.000 µg de ADN por kg de peso corporal del sujeto. La cantidad o el sitio de liberación se seleccionan deseablemente basándose en la identidad y la afección del mamífero.

La unidad de dosificación del vector adecuada para la liberación del antígeno al mamífero se describe en el presente documento. El vector se prepara para su administración mediante suspensión o disolución en un vehículo farmacéutico o fisiológicamente aceptable, tal como solución salina isotónica; solución de sales isotónicas u otras formulaciones que serán evidentes para los expertos en tal administración. El vehículo adecuado será evidente para los expertos en la técnica y dependerá en gran parte de la vía de administración. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un mamífero de acuerdo con las vías descritas anteriormente, en una formulación de liberación sostenida usando un polímero biocompatible biodegradable, o mediante liberación en el sitio utilizando micelas, geles y liposomas. Opcionalmente, la etapa de sensibilización también incluye la administración con la composición de sensibilización, de una cantidad adecuada de un adyuvante, tal como se define en el presente documento.

Preferentemente, una composición de refuerzo se administra de aproximadamente 2 a aproximadamente 27 semanas después de administrar la composición de sensibilización al sujeto mamífero. La administración de la composición de refuerzo se realiza utilizando una cantidad efectiva de una composición de refuerzo que contiene o es capaz de liberar el mismo antígeno que se administra mediante la vacuna de ADN sensibilización. La composición de refuerzo puede estar compuesta por un vector viral recombinante derivado de la misma fuente viral (por ejemplo, secuencias adenovirales como se divulga en el presente documento) o de otra fuente. Alternativamente, la "composición de refuerzo" puede ser una composición que contiene el mismo antígeno que el codificado en la vacuna de ADN de sensibilización, pero en la forma de una proteína o péptido, cuya composición induce una respuesta inmune en el huésped. En otro ejemplo, la composición de refuerzo contiene una secuencia de ADN que codifica el antígeno bajo el control de una secuencia reguladora que dirige su expresión en una célula de mamífero, por ejemplo, vectores tales vectores bacterianos o virales bien conocidos. Los requisitos principales de la composición de refuerzo son que el antígeno de la composición sea el mismo antígeno, o un antígeno de reacción cruzada, que el codificado por la composición de sensibilización.

En otro ejemplo, los vectores de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 también son muy adecuados para su uso en una variedad de otros regímenes de inmunización y terapéuticos. Tales regímenes pueden implicar la liberación de vectores de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 de forma simultánea o secuencial con vectores de Ad de cápsides de serotipos diferentes, regímenes en los que los vectores de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 se liberan de forma simultánea o secuencialmente con vectores no Ad, regímenes en los que los vectores de SAdV-39, SAdV-25.2, -30, -37 o -38 se liberan de simultáneamente o secuencialmente con proteínas, péptidos, y / u otros compuestos terapéuticos o inmunogénicos biológicamente útiles. Dichos usos serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

En otro ejemplo más, la cápside de estos virus (opcionalmente una partícula viral intacta o recombinante o una cápside vacía) se utiliza para inducir una respuesta de efecto inmunomodulador o para potenciar o coadyuvar una respuesta de células T citotóxicas a otro agente activo mediante la liberación de un adenovirus SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 al sujeto. La cápside de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 puede liberarse sola o en un régimen de combinación con un agente activo para aumentar la respuesta inmunitaria a la misma. Ventajosamente, el efecto deseado se puede lograr sin infectar al huésped con un adenovirus del subgrupo E. En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para inducir la producción de interferón alfa en un sujeto que lo necesita, que comprende liberar la cápside de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 en un sujeto. En aún otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir una o más citocinas (por ejemplo, IFN-α) / quimiocinas en cultivo. Este procedimiento implica la incubación de un cultivo que contiene células dendríticas y la cápside de SAdV-39, SAdV-25.2, -26, -30, -37 o -38 descrita en el presente documento en condiciones adecuadas para producir citocinas / quimiocinas, incluyendo interferón alfa, entre otros.

Las citocinas producidas de este modo son útiles en diversas aplicaciones. Por ejemplo, en el caso del IFNα, la producción descrita en el presente documento es particularmente deseable, ya que se cree que proporcionará ventajas sobre el IFNα producido de forma recombinante disponible comercialmente, que contiene solo uno o dos subtipos de IFNα producidos en bacterias. Por el contrario, se prevé que el procedimiento produce múltiples subtipos de IFNα humana natural, que se espera que de cómo resultado un espectro de acción más amplio. Se cree que cada subtipo emplea una actividad biológica específica. Además, se prevé que el interferón natural producido mediante el procedimiento proporcionado en el presente documento será inmunológicamente indistinguible del interferón producido de forma natural del paciente, reduciendo de este modo el riesgo de que el sistema inmunológico del sujeto rechace el fármaco, usualmente causado por la formación de anticuerpos neutralizantes contra Interferones producidos de forma recombinante.

Los siguientes ejemplos ilustran la clonación de SAdV-39, SAdV-25.2, -26,-30, -37 o -38 y la construcción de vectores recombinantes de SAdV-39, SAdV-25.2, -26,-30, -37 o -38 de ejemplo. Los ejemplos son solo ilustrativos y no se limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1 - Aislamiento de adenovirus de simio

5 Las muestras de heces se obtuvieron de la colonia de chimpancés en el Centro de Investigación New Iberia de la Universidad de Louisiana, 4401 W. Admiral Doyle Drive, New Iberia, Louisiana, EE.UU., y de la colonia de chimpancés en el Centro Michael E. Keeling para Medicina Comparativa e Investigación, Universidad de Texas, M. D. Anderson Cancer Center, Bastrop, Texas, EE.UU. Los sobrenadantes de las muestras de heces de chimpancé en suspensión en solución salina equilibrada de Hanks se esterilizaron por filtración a través de filtros de jeringa de 0,2 micrómetros. Se inocularon 100 µl de cada muestra filtrada en cultivos de la línea celular humana A549. Estas células se cultivaron en F12 de Ham con 10 % de FBS, 1 % de Penn-Strep y 50 µg / ml de gentamicina. Después de aproximadamente 1 a 2 semanas en cultivo, el efecto citopático visual (CPE) fue evidente en cultivos celulares con varios de los inóculos. Los adenovirus se purificaron a partir de cultivos en células A549 usando técnicas estándar de gradiente de cloruro de cesio publicadas para la purificación de adenovirus. El ADN de los adenovirus purificados se aisló y secuenció por completo secuenciado por Qiagen Genomic Services, Hilden, Alemania.

Basándose en el análisis filogenético de las secuencias de ADN viral, se determinó que los adenovirus designados adenovirus de simio 25.2 (SAdV-25.2), adenovirus de simio 26 (SAdV-26), adenovirus de simio 30 (SAdV-30), adenovirus de simio 37 (SAdV-37), adenovirus de simio 38 (SAdV-38) y adenovirus de simio 39 (SAdV-39) estaban en el mismo subgrupo que el subgrupo humano E.

20 El análisis de secuencias reveló que la coincidencia de hexones más cercana al hexón del SAdV-26 es el adenovirus de chimpancé 6 (98,4 por ciento (%) de identidad) y la coincidencia de fibra más cercana es el adenovirus humano 4 (93 % de identidad).

El análisis de la secuencia reveló que la coincidencia genómica más cercana del virus SAdV25.2 es el adenovirus de simio (chimpancé) 25 [número de acceso en Genbank AC000011]. SAdV25 se denominó previamente C68 o Pan9 [patente de Estados Unidos n.º 6083716]. A nivel de ácidos nucleicos, existe una identidad del 94 % entre SAdV25.2 y SAdV25 como se determina mediante el vector NTI-AlignX. Al nivel de hexón (aminoácido), el SAdV-25.2 tiene una identidad del 99 % con el adenovirus de simio 25 con dos cambios conservadores de aminoácidos y dos cambios no conservadores. La siguiente tabla muestra los cambios de aminoácidos en SAdV25.2 en comparación con la secuencia de hexón de SAdV25, con referencia al hexón de SAdV25.2 proporcionado en el presente documento en la SEQ ID NO: 140. La numeración de ambas secuencias es idénticas.

Residuo de aminoácido SEQ ID NO: 140	Cambio SAdV-25.2 (vs. SAdV25)
181	Glu (Lys) (no conservador)
404	Lys (Arg)
477	Ala (Thr) (no conservador)
497	Ala (Ser)
838	(Ala) (Thr) (no conservador)

La metodología utilizada para crear los vectores era crear primero un clon molecular de plásmido bacteriano de todo el vector adenoviral con delección de E1, seguido de transfección del ADN plasmídico en la línea celular complementaria de E1 HEK 293 para rescatar el vector viral.

35 Con el fin de crear clones moleculares de un vector adenoviral con delección de E1, primero se crearon clones moleculares del plásmido de los adenovirus con delección de E1 en los que se han insertado sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de corte raro I-CeuI y PI-SceI en lugar de una delección E1. Los casetes de expresión flanqueados por I-CeuI y PI-SceI y escindidos usando estas enzimas de restricción se ligaron en los clones del plásmido adenoviral con delección de E1. El clon molecular adenoviral del plásmido que aloja el casete de expresión deseado en lugar de la delección de E1 se transfectaron en células HEK 293 para rescatar los vectores adenovirales recombinantes. Se descubrió que el rescate después de la transfección se facilitaba primero mediante la liberación del primer genoma adenoviral lineal a partir del plásmido mediante digestión con enzimas de restricción.

Ejemplo 2. Construcción de clones moleculares de plásmido con delección de E1 basados en SAdV-39, SAdV-25.2, SAdV-26, SAdV-30, SAdV-37, o SAdV-38 usando técnicas de biología molecular estándar

45 A. Construcción del vector de SAdV-39

Se preparó un vector con delección de E1 usando el SAdV-39 (subgrupo E) como se ha descrito.

1. *Construcción de pSR3:*

Un enlazador que contenía sitios *SmaI*, *HindIII*, *EcoRV* flanqueados por sitios *SwaI* se clonó en pBR322 cortado con *EcoRI* y *NdeI* del siguiente modo. Los oligómeros SEQ ID NO: 196: SV25 Superior: AATTATTTAAATCCCGGGTATCAA-GCTTGATAGATATCATTAAAT y SEQ ID NO: 197: SV25 Bot TAATTTAAATGATATCTATCAAGCTTGATACCCGGGATTTAAAT se hibridaron juntos para crear el enlazador.

2. *Clonación del extremo izquierdo viral de SAdV-39 en el sitio HindIII (7152)*

El ADN viral se digirió con *HindIII* y el fragmento del extremo izquierdo de 7.152 pb se clonó en pSR3 digerido con *SmaI* y *HindIII* para dar pSR3 C39 LE.

3. *Delección funcional de E1 e inserción de los sitios I-Ceul y PI-SceI:*

Se delecionó el plásmido pC39LE entre *SnaBI* y *NdeI* (con Klenow) para eliminar E1a y la mayor parte de las regiones de codificación de E1b; en su lugar se ligó un fragmento de ADN (el fragmento de *EcoRV* de los sitios de pBleuSK I-PI que albergaban I-Ceul y PI-SceI) para producir pC39LEIP.

4. *Clonación del extremo derecho viral de SAdV-39 en el sitio NheI (35779).*

El ADN viral de SAdV-39 se digirió con *NheI* y el fragmento del extremo derecho de 775 pb se clonó en pC39LEIP entre *EcoRV* y *NheI* para producir pC39LE IP RE.

5. *Clonación del fragmento viral de SAdV-39 NheI (3033 – 35779)*

Se digirió el plásmido pC37-LE-IP-RE con *HindIII* y se ligó el fragmento *NheI* viral de 32746 pb. El clon con la orientación correcta se denominó pC39 IP.

B. Construcción de un clon molecular de plásmido con delección de E1 basado en SAdV-25.2, utilizando técnicas de biología molecular estándar

Se preparó un vector con delección de E1 usando el SAdV-25,2 (subgrupo E) como se ha descrito.

1. *Construcción de pSR6:*

Un enlazador que contenía sitios *SmaI*, *AscI*, *AvrII*, *EcoRV* flanqueados por sitios *PacI* se clona en pBR322 cortado con *EcoRI* y *NdeI* del siguiente modo. Los oligómeros SEQ ID NO: 198: pSR6 superior: AATTTTAAATTAACCCGGGTATCGGC-GCGCCTTAACCTAGGGATAGATATCTTAATTAA y SEQ ID NO: 199: pSR6 bot: TATTAATTAAGATATCTATCCCTAGGTTAAGCGCGCCGATACCCGGGTTAATTAA se hibridaron juntos para crear el enlazador.

2. *Clonación del extremo izquierdo viral en el sitio AscI (7959)*

El ADN viral se digirió con *AscI* y el fragmento del extremo izquierdo de 7959 pb se clonó en pSR6 digerido con *SmaI* y *AscI* para dar pSR5 C25.2 LE.

3. *Delección funcional de E1 e inserción de los sitios I-Ceul y PI-SceI:*

El plásmido pSR5 C25.2 LE se digirió con *SnaBI* + *NdeI*; el sitio *NdeI* se rellenó con Klenow. El fragmento *EcoRV* de pBleuSK I-PI se ligó para crear pSR5 C25.2 LE IP.

4. *Clonación del extremo derecho viral en el sitio XbaI (30071):*

El plásmido pSR5 C25.2 LE IP se digirió con *XbaI* + *EcoRV*. El fragmento del extremo derecho de 6559 pb (digestión con *XbaI*) del ADN de SAdV-25.2 se ligó para crear pAdC12-LE-IP-RE.

5. *Clonación del fragmento XbaI medio viral (6037 - 30071)*

El plásmido pAdC12-LE-IP-RE se digirió con *XbaI*. El fragmento de 24034 pb del ADN de SAdV-25.2 se ligó para crear pAdC25.2 IP.

C. Construcción de un clon molecular de plásmido con delección de E1 basado en SAdV-26, utilizando técnicas de biología molecular estándar

Se preparó un vector con delección de E1 usando el SAdV-26 (subgrupo E) como se ha descrito.

1. *Construcción de pSR35:*

Un enlazador que contenía sitios *SmaI*, *Clal*, *XbaI*, *SpeI*, *EcoRV* flanqueados por sitios *SwaI* se clona en pBR322 cortado con *EcoRI* y *NdeI*.

Los oligonucleótidos sintéticos SV39T, SEQ ID NO: 194 AATTATTTAAATCCCGGGGATCATCGATGATCTCTAGAGACTACTAGTCTAGGAT ATCATTAAA y SV39B, SEQ ID NO: 195 TATTTAAATGATATCCTAGACTAGT-GATCTCTAGAGATCATCGATGATCCCGGGATTAAAT se hibridaron para crear el enlazador.

5 2. Clonación del extremo izquierdo viral en el sitio *XbaI* (6029)

El ADN viral se digirió con *XbaI* y los fragmentos de 6 kb (extremos izquierdo y derecho) se purificaron en gel y se ligaron en pSR5 digerido con *SmaI* y *XbaI*.

3. Deleción funcional de *E1* e inserción de los sitios *I-CeuI* y *PI-SceI*:

10 El plásmido pSR5-C12-LE se digirió con *SnaBI* + *NdeI*; el sitio *NdeI* se rellenó con Klenow. El fragmento *EcoRV* de pBleuSK I-PI se ligó para crear pAdC12-LE-IP.

4. Clonación del extremo derecho viral en el sitio *XbaI* (30158):

El plásmido pAdC12-LE-IP se digirió con *XbaI* + *EcoRV*. El fragmento del extremo derecho de 6471 pb (digestión con *XbaI*) del ADN de SAdV-26 se ligó para crear pAdC12-LE-IP-RE.

5. Clonación del fragmento *XbaI* medio viral (6029 - 30158)

15 El plásmido pAdC12-LE-IP-RE se digirió con *XbaI* + *EcoRV*. El fragmento de 24129 pb del ADN de SAdV-26 se ligó para crear pC26 IP.

D. Construcción del vector de SAdV-30

Se preparó un vector con deleción de *E1* usando el SAdV-30 (subgrupo E) como se ha descrito.

1. Construcción de pSR3:

20 Un enlazador que contenía sitios *SmaI*, *HindIII*, *EcoRV* flanqueados por sitios *SwaI* se clonó en pBR322 cortado con *EcoRI* y *NdeI* del siguiente modo.

Los oligómeros SEQ ID NO: 196: SV25 Superior: AATTATTTAAATCCCGGGTATCAAGCTTGATAGATATCATTAAAT y SEQ ID NO: 197: SV25 Bot: TAATTTAAATGATATCTATCAAGCTTGATACCCGGGATTAAAT se hibridaron juntos para crear el enlazador.

25 2. Clonación del extremo izquierdo viral en el sitio *HindIII* (7146)

El ADN viral se digirió con *HindIII* y el fragmento del extremo izquierdo de 7146 pb se clonó en pSR3 digerido con *SmaI* y *HindIII* para dar pSR3 C30 LE.

3. Deleción funcional de *E1* e inserción de los sitios *I-CeuI* y *PI-SceI*:

30 El plásmido pSR3C30 LE se digirió con *SnaBI* + *NdeI*; el sitio *NdeI* se rellenó con Klenow. El fragmento *EcoRV* de pBleuSK I-PI se ligó para crear pC30 LE IP. El sitio *EcoRI* interno (en la posición 1040 pb desde el comienzo de la ITR izquierda) se destruyó digiriendo pC30 LE IP con *EcoRI*, llenando los salientes con polimerasa de Klenow y volviendo a ligar. Esto produjo el plásmido pC30 LE IP (*EcoRI* del).

4. Clonación del extremo derecho viral en el sitio *HindIII* (33048):

35 El plásmido pC30 LE IP (*EcoRI* del) se digirió con *HindIII* + *EcoRV*. El fragmento del extremo derecho de 3574 pb (digestión con *HindIII*) del ADN de SAdV-30 se ligó para crear pC30-LE-IP-RE.

5. Clonación del fragmento medio viral *XbaI* (6035) a *EcoRI* (33631)

El plásmido pC30-LE-IP-RE se digirió con *XbaI* + *HindIII*. El fragmento de 27596 pb del ADN de SAdV-30 se ligó para crear pC30 IP.

E. Construcción del vector de SAdV-37

40 Se preparó un vector con deleción de *E1* usando el SAdV-37 (subgrupo E) como se ha descrito.

1. Construcción de pSR3:

45 Un enlazador que contenía sitios *SmaI*, *HindIII*, *EcoRV* flanqueados por sitios *SwaI* se clonó en pBR322 cortado con *EcoRI* y *NdeI* del siguiente modo. Los oligómeros: SEQ ID NO: 196: SV25 Superior: AATTATTTAAATCCCGGGTATCAAGCTTGATAGAT-ATCATTAAAT y SEQ ID NO: 197: SV25 Bot: TAATTTAAATGATATCTATCAAGCTTGATACCCGGGATTAAAT se hibridaron juntos para crear el enlazador.

2. Clonación del extremo izquierdo viral de SAdV-37 en el sitio HindIII (7147)

El ADN viral se digirió con *HindIII* y el fragmento del extremo izquierdo de 7147 pb se clonó en pSR3 digerido con *SmaI* y *HindIII* para dar pSR3 C37 LE.

3. Deleción funcional de E1 e inserción de los sitios I-Ceul y PI-Scel:

- 5 Se deleccionó el plásmido pSR3 C37LE entre *SnaBI* y *NdeI* (con Klenow) para eliminar E1a y la mayor parte de las regiones de codificación de E1b; en su lugar se ligó un fragmento de ADN (el fragmento de EcoRV de los sitios de pBleuSK I-PI que albergaban I-Ceul y PI-Scel) para producir pSR3 C37 LE IP.

4. Clonación del extremo derecho viral de SAdV-37 en el sitio HindIII (33048).

- 10 El plásmido pC37 LE IP se digirió con *HindIII* + *EcoRV*. El fragmento del extremo derecho de 3575 pb (digestión con *HindIII*) del ADN de SAdV-37 se ligó para crear pC37-LE-IP-RE.

5. Clonación del fragmento viral de SAdV-37 HindIII (23522 – 33060)

Se digirió el plásmido pC37-LE-IP-RE con *HindIII* y se ligó el fragmento HindIII viral de 9538 pb. El clon con la orientación correcta se denominó pC37 del Xba Pac.

6. Clonación del fragmento viral de SAdV-37 XbaI (6036) *PacI*(30181)

- 15 El plásmido pC37 del Xba Pac se digirió con *XbaI* y *PacI* se ligó el fragmento *XbaI-PacI* viral de 24145 pb para producir pC37IP.

F. Construcción de vectores adenovirales con deleción de E1

- 20 Con el fin de insertar un segmento de ADN que alberga los sitios de reconocimiento I-Ceul y PI-Scel en lugar de una deleción de E1, se usó el plásmido pBleuSK I-PI. El plásmido pBleuSK I-PI contiene un fragmento de 654 pb insertado en el sitio EcoRV de pBluescript II SK (+) (Stratagene). El segmento de 654 pb alberga sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de corte raro I-Ceul y PI-Scel. Con el fin de insertar un segmento de ADN que alberga los sitios de reconocimiento I-Ceul y PI-Scel en lugar de una deleción de E1, pBleuSK I-PI se digirió con EcoRV y el fragmento de 654 pb se ligó en la localización de la deleción de E1 del genoma del adenovirus. La secuencia del ADN insertado se muestra a continuación flanqueada por los sitios de reconocimiento EcoRV. Las secuencias de reconocimiento para I-Ceul y PI-Scel están subrayadas.

SEQ ID NO: 200:

GATATCATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTAACTATAACGGTCCTAAGGTA
GCGAAAGCTCAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCT
 GATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTG
 AGTAGTGCGCGAGCAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATT
 GCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGC
 CAGATATACGCGGTACGAAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC
 AGCCATCTGTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCCTGGAAGGTGCCAC
 TCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG
 TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG
 GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCG
 GAAAGAACCAGCAGATCTGCAGATCTGAATTCATCTATGTCGGGTGCGGAGAAA
GAGGTAATGAAATGGCATTATGGGTATTATGGGTCTGCATTAATGAATCGGCCA
 GATATC

- 30 Para construir los vectores adenovirales con deleción de E1 que expresan la nucleoproteína del virus de la gripe, la secuencia de nucleótidos que codifica el virus de la gripe A H1N1 NP (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai, nº de acceso en GenBank AF389119.1) se optimizó por codones y se sintetizó completamente (Celtek Genes, Nashville, TN). Se construyó un casete de expresión compuesto por el promotor temprano de citomegalovirus humano se construyó un intrón sintético (obtenido a partir del plásmido pCI (Promega, Madison, Wisconsin), la secuencia de codificación de la gripe NP optimizada por codones y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El plásmido pShuttle CMV PI FluA NP alberga el casete de expresión descrito anteriormente en el que está flanqueado por los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de corte raro I-Ceul y PI-Scel (New England Biolabs), respectivamente. Con el fin de crear un clon molecular de un vector adenoviral con deleción de E1, los clones moleculares del plásmido de los adenovirus con deleción de E1 se crearon como se describe en las partes anteriores de este ejemplo, en los que se han insertado sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de corte raro I-Ceul y PI-Scel en lugar de una deleción E1. Después, los plásmidos adenovirales con deleción de E1 fueron digeridos con I-Ceul y PI-Scel y el casete de expresión (digerido por las mismas enzimas) se ligó. Los clones moleculares del plásmido adenoviral resultante resultantes se transfectaron en células HEK 293 para rescatar el

vector adenoviral recombinante. Se descubrió que el rescate después de la transfección se facilitaba primero mediante la liberación del primer genoma adenoviral lineal a partir del plásmido mediante digestión con enzimas de restricción.

Ejemplo 3 Evaluación de anticuerpos de neutralización cruzada

5 Se evaluaron SAdV-25, SAdV-30, SAdV-37 y SAdV-38 de tipo salvaje para determinar la actividad de neutralización cruzada en comparación con el adenovirus 5 humano (subespecie C) y el adenovirus 7 de chimpancé (SAdV- 24), y la IgG humana combinada utilizando un ensayo de anticuerpos neutralizantes de inhibición de la infección monitorizados por inmunofluorescencia directa. La IgG combinada humana [IgG de Hu combinada] se adquiere comercialmente y está aprobada para administrar en pacientes inmunocomprometidos, ya que contiene anticuerpos
10 contra diversos antígenos a los que está expuesta la población humana en general. La presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes frente a los adenovirus de simio para la IgG humana combinada es un reflejo de la prevalencia de los anticuerpos frente a estos adenovirus en la población general.

El ensayo se realizó como se describe a continuación. Las muestras de suero obtenidas de conejos a los que se ha inyectado previamente HAdV-5 o SAdV-24 se inactivaron con calor a 56 °C durante 35 minutos. Se diluyó el adenovirus de tipo salvaje (10^8 partículas / pocillo) en medio Eagle modificado por Dulbecco libre de suero (DMEM) y se incubaron con diluciones en serie por dos veces de muestras de suero inactivadas por calor en DMEM durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se añadió la mezcla de suero-adenovirus a los portaobjetos en pocillos con monocapa de 10^5 células A549. Después de 1 hora, las células de cada pocillo se suplementaron con 100 µl de suero bovino fetal (FBS) al 20 %-DMEM y se cultivaron durante 22 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. A continuación, las células se enjuagaron dos veces con PBS y se tiñeron con DAPI y un anticuerpo de cabra de reacción cruzada amplia marcado con FITC (Virostat) producido contra HAdV-5 tras fijación en paraformaldehído (4 %, 30 minutos) y permeabilización en Triton al 0,2 % (4 °C, 20 minutos). El nivel de infección se determinó contando el número de células positivas para FITC con microscopía. El título de NAB se indica como la dilución de suero más alta que inhibió la infección por adenovirus en un 50 % o más, en comparación con el control de suero intacto. Cuando se muestra un valor del título
25 <1/20, la concentración de anticuerpos neutralizantes estaba por debajo del límite de detección, es decir, 1/20.

Especie	Virus	Anti-HAdV-5	Anti-SAdV-24	IgG combinada H
C	HAdV-5	1/81.920	< 1/20	1/640
E	SAdV-24 (C7)	< 1/20	1/655.360	1/20
	SAdV-25.2	< 1/20	1/655.360	1/40
	SAdV-26	1/20	1/40.960	1/20
E	SAdV-30	< 1/20	1/1.280	1/20
	SAdV-37	< 1/20	1/320	1/20
	SAdV-39	< 1/20	1/320	1/20

Estos datos indican que existe una inmunorreactividad mínima a estos adenovirus en la población general. Estos datos indican además que los adenovirus de simio en la Tabla precedente que no reaccionan de forma cruzada con HAdV-5 y SAdV-24 pueden usarse en regímenes que implican la liberación secuencial de adenovirus, por ejemplo, terapias de sensibilización-refuerzo y del cáncer.
30

Ejemplo 4 – Inducción de citocinas

Se aislaron células dendríticas plasmocitoides a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana (PBMC) y se cultivaron en medio en placas de 96 pocillos e infectaron con adenovirus. 48 horas más tarde se centrifugan las células y se recogen el sobrenadante y se analiza la presencia de interferón α.

35 Más específicamente, las PBMC se obtuvieron del Centro para la Investigación del SIDA (CFAR) núcleo de inmunología en la Universidad de Pennsylvania. A continuación, se usaron 300 millones de estas células para aislar células dendríticas plasmocitoides (pDC) utilizando el "kit de aislamiento de células dendríticas plasmocitoides humanas" de Miltenyi Biotec de acuerdo con las instrucciones proporcionadas junto con el kit. El aislamiento utilizando este kit se basó en la eliminación de todos los otros tipos de células, excepto las pDC de PBMC.

40 Los números de células finales suelen variar de un donante a otro, pero van desde 0,4-0,7 millones de células. Por lo tanto, los datos que se han generado (que se analizan a continuación) provienen del análisis de células de múltiples donantes. Sorprendentemente, sin embargo, la separación de subgrupos basados en interferón u otra liberación de citocinas se mantiene incluso cuando se analizan células de múltiples donantes.

Las células se cultivaron en medio RPMI – 1640 (Mediatech) suplementado con L-glutamina, 10 % de suero bovino fetal (Mediatech), solución tampón Hepes 10 mM (Invitrogen), antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina de Mediatech) e interleucina 3 humana (20 ng/ml – R&D). Los adenovirus de tipo salvaje se añadieron directamente a las células a una multiplicidad de infección (MOI) de 10.000 (10.000 partículas virales por célula, con una concentración de 10^6 células / ml). 48 horas más tarde se centrifugaron las células y el sobrenadante se analizó para detectar la presencia de interferón α . Las citocinas se midieron usando un kit de ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de PBL Biomedical Laboratories usando el protocolo recomendado del fabricante.

El estudio mostró que los adenovirus del subgrupo C no producían cantidades detectables de IFN α (el ensayo tiene un límite de detección de 1250 pg / ml). Por el contrario, todos los miembros analizados de los adenovirus del subgrupo E produjeron IFN α y, en general, produjeron significativamente más IFN α en comparación con los adenovirus del subgrupo B.

También se detectaron otras diversas citocinas en el cribado de los adenovirus. Sin embargo, en general, los adenovirus del subgrupo E produjeron niveles significativamente más altos de IL-6, RANTES, MIP-1 α , TNF- α , IL-8 e IP-10 que los adenovirus del subgrupo C. Los adenovirus del subgrupo B también superaron a los adenovirus del subgrupo C en la inducción de IFN α , IL-6, RANTES y MIP1 α .

Dado que no se observó ninguna lisis celular significativa en este estudio, esto sugiere que la citocina se produce por contacto de las células con el adenovirus del subgrupo E, sin tener en cuenta la infección y en ausencia de cualquier cantidad significativa de replicación viral.

En otro estudio (no mostrado), las células se incubaron como se ha descrito anteriormente, ya sea con proteínas de cápside C7 vacías (Ad subgrupo E) o vector viral C7 de adenovirus inactivado con UV (la inactivación con UV causa reticulación, eliminando la expresión génica del adenovirus). En estos estudios, se observaron niveles iguales o superiores de IFN α tanto para la cápside vacía como para el vector viral inactivado en comparación con C7 intacto.

Los inventores han descubierto que exponer células productoras de citoCinas o células productoras de quimiocinas, tales como PBMC, PBL y células dendríticas, a una cápside de un miembro del adenovirus del subgrupo E induce citocinas y, en particular, IFN α o quimiocinas en cantidades significativamente más altas que las inducidas por otros subgrupos de adenovirus. Por lo tanto, los miembros de este subgrupo son útiles para inducir interferón alfa y, en cantidades más pequeñas, un número de otras citocinas / quimiocinas en cultivo.

En el caso del IFN α , el procedimiento de producción es particularmente deseable, ya que se cree que es ventajoso sobre el IFN α producido de forma recombinante. Por el contrario, se prevé que el procedimiento proporcionado en el presente documento produce múltiples subtipos de IFN α humana natural, que se espera que de cómo resultado un espectro de acción más amplio. Se cree que cada subtipo emplea una actividad biológica específica. Además, se prevé que el interferón natural producido mediante el procedimiento proporcionado en el presente documento será inmunológicamente indistinguible del interferón producido de forma natural del paciente, reduciendo de este modo el riesgo de que el sistema inmunológico del paciente rechace el fármaco, usualmente causado por la formación de anticuerpos neutralizantes contra Interferones producidos de forma recombinante.

Otras citocinas producidas por los adenovirus del subgrupo E incluyen interleucina (IL) - 6, IL - 8, IP - 10, proteína 1 inflamatoria de macrófagos - alfa (MIP - 1 α), RANTES y factor de necrosis tumoral alfa. Los procedimientos para purificar estas citocinas / quimiocinas del cultivo y usos terapéuticos o adyuvantes de estas citocinas / quimiocinas se han descrito en la literatura. Además, pueden utilizarse columnas o kits comercialmente disponibles para la purificación de las citocinas / quimiocinas preparadas descritas en el presente documento. Las citocinas / quimiocinas producidas como se divulga en el presente documento pueden formularse para su uso en diversas indicaciones.

Por ejemplo, las citocinas descritas en el presente documento incluyen interferón alfa (IFN α), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IP-10 (proteína inducible por interferón gamma), interleucina-6 (IL-6) e IL-8. Se ha descrito que el IFN α es útil en el tratamiento de la gripe, la hepatitis (incluyendo, por ejemplo, la hepatitis B y C) y diversas neoplasias, por ejemplo, riñón (carcinoma de células renales), melanoma, tumor maligno, mieloma múltiple, tumor carcinoide, linfoma y leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica y leucemia de células pilosas). Una mezcla de subtipos de IFN α producidos como se describe en el presente documento puede purificarse usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, el documento WO 2006/085092, que describe el uso de anticuerpos monoclonales y purificación en columna. En la bibliografía se han descrito otras técnicas.

El IFN α producido como se describe en el presente documento puede purificarse usando procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.680.260, la patente de Estados Unidos n.º 4.732.683, y G. Allen, Biochem J., 207: 397-408 (1982). Se ha descrito que el TNF α es útil en el tratamiento de trastornos autoinmunes, entre los que se incluyen, por ejemplo, psoriasis y artritis reumatoide. La IP-10, proteína inducible por el interferón gamma, se puede usar como inhibidor potente de la angiogénesis y tiene un potente efecto antitumoral dependiente del timo.

Por lo tanto, en aún otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir IFN α mediante la incubación de un cultivo que contiene células dendríticas y una cápside de adenovirus del subgrupo E en condiciones adecuadas para

producir citocinas.

5 En un ejemplo, se extrae sangre de donantes sanos (preferentemente, seres humanos) y se preparan leucocitos de sangre periférica (PBL) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando técnicas conocidas. En un ejemplo, se usan PBL como células productoras de citocinas de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento. En otro ejemplo, se usan PBMC como células que producen citocinas. En otro ejemplo, se aíslan células dendríticas plasmacitoides de las PBL o las PBMC usando técnicas conocidas, por ejemplo, usando el kit disponible comercialmente "kit de aislamiento de células dendríticas plasmacitoides humanas" de Miltenyi Biotec GmbH (Alemania). Las células seleccionadas se cultivan en suspensión con un medio apropiado y la proteína de la cápside del adenovirus de subgrupo E. Un experto en la materia puede determinar fácilmente los medios apropiados. Sin embargo, en un ejemplo, el medio es un medio RPMI-1640. Como alternativa, pueden seleccionarse fácilmente otros medios.

15 Las células pueden cultivarse en un recipiente adecuado, por ejemplo, un pocillo de microtitulación, un matraz o un vaso más grande. En un ejemplo, la concentración de las células es de aproximadamente 1 millón de células / ml de medio de cultivo. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar fácilmente otras concentraciones celulares adecuadas.

Ventajosamente, la invención no requiere el uso de interferones como cebadores. Sin embargo, si se desea, los medios pueden incluir una citocina adecuada, IL - 3, con el fin de estimular el crecimiento celular. Una concentración adecuada es de aproximadamente 20 ng / ml. No obstante, se pueden usar otras concentraciones.

20 En un ejemplo, la proteína de la cápside de adenovirus se introduce en el cultivo que contiene las células. La proteína de la cápside del adenovirus puede liberarse en el cultivo en cualquiera de las formas descritas en el presente documento (por ejemplo, una partícula viral, incluyendo una partícula de la cápside vacía, un vector viral que tiene una cápside de Ad del subgrupo E, y similares). Típicamente, la proteína de la cápside se suspenderá en un vehículo adecuado, por ejemplo, medio de cultivo, solución salina, o similar.

25 De manera adecuada, las cápsides de adenovirus del subgrupo E se añaden al cultivo en una cantidad de aproximadamente 100 a 100.000 partículas de adenovirus del subgrupo E por célula. A continuación, la mezcla se incuba, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 40 °C, en el intervalo de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C, o aproximadamente 37 °C.

30 Típicamente, aproximadamente de 12 a 96 horas, o aproximadamente 48 horas después, las células se centrifugan y el sobrenadante se recoge. Adecuadamente, esto se realiza en condiciones que evitan la lisis celular, reduciendo o eliminando de este modo la presencia de desechos celulares en el sobrenadante. La centrifugación permite la separación de las citocinas de las células, proporcionando de este modo una citocina aislada en crudo. Las columnas de calibrado y otras columnas y procedimientos conocidos están disponibles para la purificación adicional de citocinas a partir de adenovirus y cápsides adenovirales, y similares.

Estas citocinas, purificadas de esta manera, están disponibles para su formulación y uso en diversas aplicaciones.

35 Como se describe en el presente documento y sin estar limitado por la teoría, la capacidad de potenciación inmunitaria y / o productora de citocinas del adenovirus del subgrupo E parece estar basada en el contacto entre las células y la cápside adenoviral, sin tener en cuenta la capacidad de infección o de replicación de la partícula adenoviral. De este modo, en un ejemplo, una partícula vacía de adenovirus del subgrupo E (es decir, una cápside adenoviral que no tiene ningún ADN empaquetado en su interior que exprese producto o transgén adenoviral) se libera en las células. En otro ejemplo, se utiliza una partícula no infecciosa de subgrupo E de tipo salvaje o un vector adenoviral recombinante empaquetado en una cápside (partícula) del subgrupo E adenoviral. En la materia se conocen técnicas adecuadas para inactivar tales partículas virales y pueden incluir, sin limitación, por ejemplo, irradiación por UV (que reticula eficazmente el ADN genómico evitando la expresión).

45 Numerosas modificaciones y variaciones están incluidas en el alcance de la memoria descriptiva identificada anteriormente y se espera que sean obvias para un experto en la técnica. Tales modificaciones y alteraciones en la composición y los procedimientos, tales como selecciones de diferentes minigenes o la selección o dosificación de los vectores o moduladores inmunes se cree que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un adenovirus que tiene una cápside que comprende una proteína hexónica de la cápside de SAdV-39, los aminoácidos 1 a 940 de la SEQ ID NO: 11, encapsidando dicha cápside una molécula heteróloga portadora de un gen unido operativamente a secuencias de control de la expresión que dirigen la transcripción, la traducción y / o la expresión de las mismas en una célula huésped y elementos cis de adenovirus en 5' y 3' necesarios para la replicación y encapsidación.
2. El adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho adenovirus tiene replicación defectuosa.
3. El adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho virus tiene una cápside híbrida, en la que el pentón o la proteína de fibra se selecciona de:
- una proteína pentónica de SADV-30, aminoácidos 1 a 533 de la SEQ ID NO: 103; una proteína pentónica de SADV-25,2, aminoácidos 1 a 531 de la SEQ ID NO: 135; una proteína pentónica de SADV-37, aminoácidos 1 a 542 de la SEQ ID NO: 38; una proteína pentónica de SADV-38, aminoácidos 1 a 539 de la SEQ ID NO: 70; una proteína pentónica de SADV-26, aminoácidos 1 a 546 de la SEQ ID NO: 167; y una proteína de la fibra de SADV-30, aminoácidos 1 a 445 de la SEQ ID NO: 118; una proteína de la fibra de SADV-25.2, aminoácidos 1 a 443 de la SEQ ID NO: 151; una proteína de la fibra de SADV-37, aminoácidos 1 a 445 de la SEQ ID NO: 54; una proteína de la fibra de SADV-38, aminoácidos 1 a 425 de la SEQ ID NO: 85; una proteína de la fibra de SADV-26, aminoácidos 1 a 425 de la SEQ ID NO: 183.
4. El adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho vector comprende más de una proteína de la cápside de SAdV-39, estando dicha proteína de la cápside seleccionada de una o más de una proteína pentónica de SAdV - 39, aminoácidos 1 a 532 de la SEQ ID NO: 6 y una proteína de la fibra de SADV-39, aminoácidos 1 a 489 de la SEQ ID NO: 22.
5. Un adenovirus recombinante que tiene una cápside que comprende un hexón que contiene un fragmento de una proteína hexónica de adenovirus simio y una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la SAdV, en la que el fragmento de la proteína hexónica SAdV es la proteína hexónica SAdV de SEQ ID NO: 11 con un truncamiento en N-terminal o en C-terminal de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud o se selecciona del grupo que consiste en:
- los restos de aminoácidos 125 a 443 de la SEQ ID NO: 11; y los restos de aminoácidos 138 a 441 de la SEQ ID NO: 11
- en la que dicho adenovirus recombinante comprende elementos cis de adenovirus en 5' y 3' necesarios para la replicación y encapsidación, comprendiendo dichos elementos cis una repetición terminal invertida en 5' del adenovirus y una repetición terminal invertida en 3' del adenovirus, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto unida operativamente a las secuencias que dirigen la expresión de dicho producto en una célula huésped.
6. El adenovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cápside comprende además una proteína de fibra SAdV - 39, SAdV - 30, SAdV - 25,2, SAdV - 37, SAdV - 38 o SAdV - 26.
7. El adenovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la cápside comprende además una proteína pentónica SAdV - 39, SAdV - 30, SAdV - 25,2, SAdV - 37, SAdV - 38 o SAdV - 26.
8. El adenovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho adenovirus es un adenovirus pseudotipado.
9. El adenovirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el adenovirus recombinante comprende uno o más genes de adenovirus y se deleciona en la E1 del adenovirus.
10. Una composición que comprende un virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un adenovirus recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, para su uso en la administración de una molécula a una célula diana que tiene un receptor adenoviral.