

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 165**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2008 PCT/US2008/013065**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09073103**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008 E 08857781 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2220242**

54 Título: **Adenovirus de simio de la subfamilia B SADV-28, -27, -29, -32, -33 y -35 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

28.11.2007 US 4466

28.11.2007 US 4531

28.11.2007 US 4534

28.11.2007 US 4567

28.11.2007 US 4542

28.11.2007 US 4533

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

03.07.2017

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:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 621 165 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 de simio de la subfamilia B SAdV-28, -27, -29, -32, -33 y -35 y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Un adenovirus es un virus de ADN bicatenario con un tamaño de genoma de aproximadamente 36 kilobases (kb), que ha sido ampliamente usado para aplicaciones de transferencia génica debido a su capacidad para conseguir una transferencia génica muy eficaz en una diversidad de tejidos objetivo y a su gran capacidad transgénica. Convencionalmente, los genes E1 del adenovirus son deletados y sustituidos por un casete transgénico que consiste en el promotor de elección, la secuencia de ADNc del gen de interés y una señal de poli A, dando como resultado un virus recombinante con una replicación defectuosa.

Los adenovirus tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica que consiste en tres proteínas principales, la hexona (II), la base de pentona (III) y una fibra knobbed (IV), junto con otras varias proteínas menores, VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 [W. C. Russell, J. Gen Virol., 81: 2573-2604 (noviembre de 2000)]. Las secuencias de ácidos nucleicos del genoma del virus es un ADN bicatenario lineal con una proteína terminal unida covalentemente al 5' terminal, que tiene repeticiones terminales invertidas (ITR). El ADN del virus está íntimamente asociado con la proteína muy básica VII y un pequeño péptido pX (anteriormente denominado mu). Otra proteína, la V, está empaquetada en este complejo de ADN-proteína y proporciona una conexión estructural con la cápside a través de la proteína VI. El virus también contiene una proteasa codificada por el virus, que es necesaria para el procesamiento de algunas de las proteínas estructurales para la producción de virus infecciosos maduros.

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

Los adenovirus recombinantes se han descrito para la administración de moléculas heterólogas a células hospedadoras. 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, han sido descritos en la Patente de Estados Unidos nº 7.247.472 como útiles como vectores de vacunas. Otros adenovirus de chimpancé se describen en el documento WO 2005/1071093 como útiles para la elaboración de adenovirus portadores en vacunas.

Lo que se necesita en la materia son vectores que administren de forma eficaz moléculas a un objetivo y minimicen el efecto de la inmunidad preexistente frente a los serotipos de adenovirus seleccionados en la población.

En el presente documento se describen secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos aisladas del adenovirus de simio 28 (SAdV-28), del adenovirus de simio 27 (SAdV-27), del adenovirus de simio 29 (SAdV-29), del adenovirus de simio 32 (SAdV-32), del adenovirus de simio 33 (SAdV-33) y del adenovirus de simio 35 (SAdV-35) y vectores que contienen estas secuencias. También se describen varios métodos para el uso de los vectores y de las células descritas en el presente documento.

Los métodos descritos en el presente documento implican la administración 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 del antígeno seleccionado para desencadenar respuestas inmunitarias protectoras. Las secuencias de ácidos nucleicos de los vectores basados en el SAdV-28, en el SAdV-27, en el SAdV-29, en el SAdV-32, en el SAdV-33 y en el SAdV-35 también pueden usarse para la producción de productos génicos heterólogos *in vitro*. Dichos productos génicos son por sí mismos útiles para diversos fines, tales como los que se describen en el presente documento.

Estas y otras realizaciones y ventajas de la invención se describen con más detalle a continuación.

55 Sumario de la invención

La invención proporciona, en un aspecto, un adenovirus que tiene una cápside que comprende: una proteína hexona del SAdV-28, los aminoácidos 1 hasta 944 de la SEQ ID NO: 11; una proteína pentona del SAdV-28, los aminoácidos 1 hasta 582 de la SEQ ID NO: 6; y una proteína de fibra del SAdV-28, los aminoácidos 1 a 323 de la SEQ ID NO: 21; 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 del mismo en una célula hospedadora y que comprende adicionalmente los elementos en cis en 5' y 3' del adenovirus necesarios para la replicación y la encapsidación.

65

La invención también se extiende a las composiciones que comprenden los adenovirus de la invención, en portadores farmacéuticos.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del adenovirus de simio 28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35, cada uno de los cuales se aisló a partir de heces de chimpancé. También se proporcionan vectores adenovíricos y líneas celulares de empaquetamiento para la producción de esos vectores para su uso en la producción *in vitro* de proteínas recombinantes o de fragmentos o de otros reactivos. Adicionalmente se proporcionan composiciones para su uso en la administración de una molécula heteróloga para fines terapéuticos o de vacuna. Dichas composiciones terapéuticas o de vacuna contienen los vectores adenovíricos portadores de una molécula heteróloga insertada. Además, las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35 son útiles para proporcionar las funciones colaboradoras esenciales necesarias para la producción de los vectores víricos adenoasociados (AAV) recombinantes. Por lo tanto, se proporcionan las construcciones colaboradoras, los métodos y las líneas celulares que usan estas secuencias en dichos métodos de producción.

El término "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a un ácido nucleico o a un fragmento del mismo, indica que, cuando están óptimamente alineadas con las apropiadas inserciones o deleciones de nucleótidos, con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), existe una identidad en la secuencia de nucleótidos de al menos entre aproximadamente el 95 y el 99 % de las secuencias alineadas.

El término "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a aminoácidos o a fragmentos de los mismos, indica que, cuando están óptimamente alineadas con las apropiadas inserciones o deleciones de aminoácidos con otro aminoácido (o su hebra complementaria), existe una identidad en la secuencia de aminoácidos de al menos entre aproximadamente el 95 y el 99 % de las secuencias alineadas. Preferiblemente, la homología es a lo largo de la totalidad de la secuencia, o de una proteína de la misma, o de un fragmento de la misma que tiene al menos 8 aminoácidos, o más deseablemente, al menos 15 aminoácidos de longitud. Algunos ejemplos de fragmentos adecuados se describen en el presente documento.

El término "porcentaje de identidad en la secuencia" o "idéntica" en el contexto de secuencias de ácidos nucleicos se refiere a los residuos de 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 penalizar por los huecos. Las secuencias que conservan la funcionalidad del polinucleótido o del polipéptido codificado por el mismo son más estrechamente idénticas. La longitud de la comparación de la identidad de la secuencia puede ser a lo largo de la totalidad del genoma (por ejemplo, de aproximadamente 36 kpb), de la totalidad de un marco abierto de lectura de un gen, de una proteína, de una subunidad o de una enzima [véanse, por ejemplo, las tablas que proporcionan las regiones codificantes adenovíricas], o de un fragmento de al menos entre aproximadamente 500 y 5.000 nucleótidos. Sin embargo, también puede desearse la identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, habitualmente de al menos aproximadamente 20 hasta 24 nucleótidos, de al menos aproximadamente 28 hasta 32 nucleótidos, de al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos. De forma análoga, el "porcentaje de identidad en la secuencia" puede ser fácilmente determinado para las secuencias de aminoácidos, a lo largo de la totalidad de la longitud de una proteína, o de un fragmento de la misma. Adecuadamente, un fragmento tiene al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, y puede tener hasta aproximadamente 700 aminoácidos. Algunos ejemplos de fragmentos adecuados se describen en el presente documento.

La identidad se determina fácilmente mediante el uso de algoritmos y de programas informáticos, tales como los que se definen en el presente documento, con sus ajustes por defecto. Preferiblemente, dicha identidad es a lo largo de la totalidad de la longitud de la proteína, de la enzima, de la subunidad, o a lo largo de un fragmento de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud. Sin embargo, la identidad puede basarse en regiones más cortas, donde son adecuadas al uso que se le está dando al producto génico idéntico.

Como se describe en el presente documento, las alineaciones pueden llevarse a cabo mediante el uso de cualquiera de una diversidad de Programas de Alineación de Secuencias Múltiples públicos o disponibles comercialmente, tales como "Clustal W", accesible a través de Web Servers en internet. Alternativamente, también se usan las utilidades Vector NTI® [InVitrogen]. También existen diversos algoritmos conocidos en la materia que pueden usarse para medir la identidad en la secuencia de nucleótidos, incluyendo los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, pueden compararse las secuencias de polinucleótidos mediante el uso de Fasta, un programa de GCG Versión 6.1. Fasta proporciona alineaciones y porcentajes de identidad en la secuencia de las regiones que mejor solapan entre las secuencias de interrogación y de búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad en la secuencia puede ser determinado mediante el uso de Fasta con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor de NOPAM para la matriz de puntuación) según se proporciona en GCG Versión 6.1. De forma análoga, hay disponibles programas para llevar a cabo las alineaciones de aminoácidos. Generalmente, estos programas se usan con los ajustes por defecto, aunque el experto en la materia puede alterar estos ajustes según sea necesario. Alternativamente, el experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o

programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad con la alineación tal y como los proporcionan los algoritmos y programas referenciados.

5 "Recombinante", aplicado a un polinucleótido, significa que el polinucleótido es el producto de varias combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligación, y de otros procedimientos que dan como resultado una construcción que es distinta al polinucleótido que se encuentra la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula vírica que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente replicados de la construcción original del polinucleótido y la progenie de la construcción del virus original.

10 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta a 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 un vector derivado de una especie diferente, es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante natural 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 específica de sitio que ha sido clonado en el genoma de un virus o en un vector vírico, en el que el genoma del virus no lo contiene de forma natural, es un sitio de recombinación heterólogo. Cuando se usa un polinucleótido con una secuencia que codifica una recombinasa para alterar genéticamente una célula que normalmente no expresa la recombinasa, tanto el polinucleótido como la recombinasa son heterólogos para la célula.

20 Según se usa a lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones, el término "comprender" y sus variantes, incluyendo "comprende", "que comprende", entre otras variantes, es incluyente de los demás componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. El término "consiste en" o "que consiste en" es excluyente de otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

25 I. Las secuencias de los adenovirus de simio

La divulgación proporciona secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35 de simio, cada una de las cuales se aísla a partir de otro material con el que están asociados a la naturaleza. Se ha determinado que cada uno de estos adenovirus está en el mismo subgrupo que el subgrupo B humano.

30 A. Secuencias de ácidos nucleicos

Las secuencias de ácidos nucleicos del SAdV-28 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos 1 a 35610 de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias de ácidos nucleicos del SAdV-27 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos 1 a 35592 de la SEQ ID NO: 39. Las secuencias de ácidos nucleicos del SAdV-29 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos 1 a 35646 de la SEQ ID NO: 71. Las secuencias de ácidos nucleicos del SAdV-32 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos 1 a 35588 de la SEQ ID NO: 103. Las secuencias de ácidos nucleicos del SAdV-33 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos 1 a 35694 de la SEQ ID NO: 134. Las secuencias de ácidos nucleicos del SAdV-35 proporcionadas en el presente documento incluyen los nucleótidos 1 a 35606 de la SEQ ID NO: 166.

Las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento engloban adicionalmente la hebra que es complementaria de las secuencias de las SEQ ID NO: 1, 29, 71, 103, 134 y 166, así como las secuencias de ARN y de ADNc correspondientes a las secuencias de las siguientes secuencias y sus hebras complementarias. En otra alternativa, la secuencia de ácidos nucleicos engloba adicionalmente secuencias que son idénticas en más del 98,5 %, y preferentemente, idénticas en más aproximadamente el 99 %, a la Lista de Secuencias. En una alternativa también se incluyen las variantes naturales y las modificaciones artificiales de las secuencias proporcionadas en las SEQ ID NO: 1, 29, 71, 103, 134 y 166 y sus hebras complementarias. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, marcadores que son conocidos en la materia, una metilación y la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un nucleótido degenerado.

TABLA 1 - REGIONES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

| Regiones | ORF DEL SAdV-28, SEQ ID NO: 1 | ORF DEL SAdV-27, SEQ ID NO: 39 | ORF DEL SAdV-29, SEQ ID NO: 71 | ORF DEL SAdV-32, SEQ ID NO: 103 | ORF DEL SAdV-33, SEQ ID NO: 134 | ORF DEL SAdV-35, SEQ ID NO: 166 |
|------------|---|---|---|---|---|---|
| ITR | 1..132 | 1..132 | 1..132 | 1..131 | 1..131 | 1..126 |
| E1a | Unir 574..1147, 1236..1441 | Unir 575..1151, 1245..1450 | Unir 574..1150, 1239..1444 | Unir 573..1149, 1238..1443 | Unir 571..1150, 1247..1449 | Unir 561..1140, 1232..1437 |
| E1b | T/19K pequeño 1612..2154 | 1621..2163 | 1615..2157 | 1614..2156 | 1620..2162 | 1606..2148 |
| | T/55K grande 1917..3401 | 1926..3410 | 1920..3404 | 1919..3403 | 1925..3409 | 1911..3395 |
| E2b | IX 3496..3909 | 3506..3919 | 3499..3912 | 3500..3913 | 3504..3917 | 3491..3904 |
| | pTP Complemento (8455..10410, 13882..13890) | Complemento (8456..10396, 13903..13911) | Complemento (8459..10438, 13910..13918) | Complemento (8456..10399, 13872..13880) | Complemento (8460..10439, 13918..13926) | Complemento (8445..10418, 13869..13877) |
| | Poli merasa Complemento (5081..8653, 13882..13890) | Complemento (5091..8456, 13903..13911) | Complemento (5085..8657, 13910..13918) | Complemento (5085..8654, 13872..13880) | Complemento (5089..8658, 13918..13926) | Complemento (5088..8643, 13869..13877) |
| | IVa2 Complemento (3978..5308, 5587..5599) | Complemento (3988..5321, 5597..5609) | Complemento (3982..5312, 5591..5603) | Complemento (3982..5312, 5591..5603) | Complemento (3986..5316, 5595..5607) | Complemento (3965..5295, 5574..5586) |
| L1 | 52/55 D 10893..12059 | 10921..12081 | 10922..12088 | 10883..12049 | 10924..12093 | 10886..12052 |
| | IIIIa 12087..13847 | 12109..13869 | 12116..13876 | 12077..13837 | 12121..13884 | 12083..13843 |
| | Pentona 13935..15680 | 13956..15644 | 13963..15690 | 13916..15670 | 13972..15684 | 13919..15607 |
| L2 | VII 15692..16267 | 15651..16226 | 15697..16272 | 15683..16258 | 15692..16264 | 15621..16196 |
| | V 16313..17362 | 16272..17321 | 16318..17367 | 16304..17353 | 16309..17358 | 16239..17297 |
| | pX 17394..17618 | 17353..17577 | 17399..17623 | 17385..17609 | 17390..17614 | 17329..17556 |
| L3 | Hexona 17696..18445 | 17655..18404 | 17699..18448 | 17687..18436 | 17691..18440 | 17632..18381 |
| | Endoproteasa 18564..21395 | 18532..21399 | 18570..21431 | 18555..21419 | 18565..21417 | 18510..21377 |
| E2a | 21430..22056 | 21430..22056 | 21462..22088 | 21455..22081 | 21457..22083 | 21253..21861 |
| | DBP Complemento (22152..23706) | Complemento (22153..23700) | Complemento (22182..23729) | Complemento (22176..23729) | Complemento (22177..23724) | Complemento (22116..23663) |
| | 100 kD 23739..26222 | 23731..26214 | 23760..26255 | 23760..26255 | 23755..26253 | 23694..26177 |
| L4 | Homólogo de 33 kD Unir 25927..26275, 26445..26809 | Unir 25919..26267, 26437..26786 | Unir 25951..26308, 26478..26836 | Unir 25951..26308, 26478..26833 | Unir 25952..26306, 26478..26828 | Unir 25882..26230, 26400..26749 |
| | 22 kD 25927..26541 | 25919..26512 | 25951..26568 | 25951..26565 | 25952..26554 | 25882..26475 |
| | VIII 26882..27562 | 26861..27541 | 26909..27589 | 26905..27585 | 26901..27581 | 26824..27504 |

TABLA 1 - REGIONES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

| Regiones | ORF DEL SA _{IV} -28, SEQ ID NO: 1 | ORF DEL SA _{IV} -27, SEQ ID NO: 39 | ORF DEL SA _{IV} -29, SEQ ID NO: 71 | ORF DEL SA _{IV} -32, SEQ ID NO: 103 | ORF DEL SA _{IV} -33, SEQ ID NO: 134 | ORF DEL SA _{IV} -35, SEQ ID NO: 166 |
|------------|--|--|--|---|---|---|
| ITR | 1..132 | 1..132 | 1..132 | 1..131 | 1..131 | 1..126 |
| 12,5 K | 27565..27879 | 27544..27861 | 27592..27906 | 27588..27902 | 27584..27901 | 27507..27824 |
| CR1-alfa | 27836..28279 | 27818..28255 | 27863..28306 | 27859..28302 | 27858..28307 | 27781..28218 |
| gp19K | 28267..28800 | 28243..28758 | 28294..28827 | 28290..28823 | 28295..28810 | 28206..28721 |
| CR1-beta | 28656..29393 | 28798..29328 | 28683..29420 | 28854..29465 | 28788..29372 | 28699..29292 |
| CR1-gamma | 29415..29978 | 29353..29919 | 29442..30005 | 29487..30293 | 29395..29958 | 29435..29872 |
| CR1-delta | 29997..30314 | 29938..30240 | 30024..30344 | | 29979..30335 | 29891..30190 |
| RID-alfa | 30347..30619 | 30286..30558 | 30377..30649 | 30306..30578 | 30380..30652 | 30234..30506 |
| RID-beta | 30594..31010 | 30533..30967 | 30624..31043 | 30553..30975 | 30627..31061 | 30481..30915 |
| 14,7 K | 31006..31401 | 30963..31367 | 31039..31434 | 30971..31372 | 31057..31461 | 30911..31315 |
| L5 | 31630..32598 | 31597..32571 | 31663..32634 | 31609..32565 | 31699..32673 | 31550..32608 |
| Orf 6/7 | Complemento (32642..32890, 33613..33816) | Complemento (32615..32863, 33586..33774) | Complemento (32678..32926, 33649..33852) | Complemento 32614.. 32862, 33576.. 33773 | Complemento (32721..32969, 33683..33880) | Complemento (32654..32902, 33613..33825) |
| Orf 6 | Complemento (32890..33816) | Complemento (32863..33774) | Complemento (32926..33852) | Complemento (32862..33773) | Complemento (32969..33880) | Complemento (32902..33825) |
| Orf 4 | Complemento (33692..34072) | Complemento (33665..34045) | Complemento (33728..34108) | Complemento (33664..34044) | Complemento (33771..34151) | Complemento (33701..34081) |
| Orf 3 | Complemento (34085..34435) | Complemento (34058..34408) | Complemento (34121..34471) | Complemento (34057..34407) | Complemento (34164..34514) | Complemento (34095..34445) |
| Orf 2 | Complemento (34435..34821) | Complemento (34408..34794) | Complemento (34471..34857) | Complemento (34407..34793) | Complemento (34514..34900) | Complemento (34445..34831) |
| Orf 1 | Complemento (34862..35233) | Complemento (34841..35212) | Complemento (34899..35270) | Complemento (34837..35208) | Complemento (34945..35316) | Complemento (34873..35244) |
| ITR | Complemento (35479..35610) | Complemento (35461..35592) | Complemento (35515..35646) | Complemento (35458..35588) | Complemento (35564..35694) | Complemento (35481..35606) |

En una alternativa se proporcionan fragmentos de las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35, y sus hebras complementarias, el ADNc y el ARN complementario del mismo. Los fragmentos adecuados tienen al menos 15 nucleótidos de longitud, y engloban fragmentos funcionales, es decir, fragmentos que son de interés biológico. Por ejemplo, un fragmento funcional puede expresar un producto adenovírico deseado o puede ser útil en la producción de vectores víricos recombinantes. Dichos fragmentos incluyen las secuencias génicas y los fragmentos recogidos en las tablas del presente documento. Las tablas proporcionan las regiones transcritas y los marcos abiertos de lectura de las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35. Para algunos genes, los transcritos y los marcos abiertos de lectura (ORF) están ubicados en la hebra complementaria a la presentada en las SEQ ID NO: 1, 29, 71, 103, 134 o 166. Véase, por ejemplo, E2b, E4 u E2a. También se muestran los pesos moleculares calculados de las proteínas codificadas. Nótese que el marco abierto de lectura E1a del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 y el marco abierto de lectura E2b, contienen sitios internos de empalme. Estos sitios de empalme están indicados en las tablas anteriores.

Las secuencias de ácidos nucleicos adenovíricos del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 son útiles como agentes terapéuticos y para la construcción de una diversidad de sistemas de vectores y células hospedadoras. Según se usa en el presente documento, un vector incluye cualquier molécula de ácido nucleico adecuada, incluyendo un ADN desnudo, un plásmido, un virus, un cósmido o un episoma. Estas secuencias y productos pueden usarse solos o junto con otras secuencias o fragmentos adenovíricos, o junto con elementos de otras secuencias adenovíricas o no adenovíricas. Las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 también son útiles como vectores de administración antisentido, vectores para la terapia génica o vectores para vacunas. Por lo tanto, adicionalmente se proporcionan moléculas de ácido nucleico, vectores para la administración de genes y células hospedadoras que contienen las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35.

Por ejemplo, la invención engloba una molécula de ácido nucleico que contiene las secuencias ITR de un Ad de simio de la invención. En otro ejemplo, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que contiene las secuencias de un Ad de simio de la invención que codifican un producto génico del Ad deseado. Otras moléculas más de ácidos nucleicos construidas mediante el uso de las secuencias de la invención serán evidentes para el experto en la materia, en vista de la información proporcionada en el presente documento.

En una realización, las regiones génicas del Ad de simio identificadas en el presente documento pueden usarse en una diversidad de vectores para la administración de una molécula heteróloga a una célula. Por ejemplo, se generan vectores para la expresión de una proteína de la cápside adenovírica (o de un fragmento de la misma) con el fin de generar un vector vírico en una célula hospedadora de empaquetamiento. Dichos vectores pueden estar diseñados para su expresión en *trans*. Alternativamente, dichos vectores están diseñados para proporcionar células que contienen de forma estable secuencias que expresan las funciones adenovíricas deseadas, por ejemplo, una o más de E1a, E1b, las secuencias repetitivas terminales, E2a, E2b, E4, la región E4ORF6.

Además, las secuencias génicas adenovíricas y los fragmentos de las mismas son útiles para proporcionar las funciones colaboradoras necesarias para la producción de los virus dependientes de colaboradores (por ejemplo, vectores adenovíricos con funciones esenciales eliminadas, o virus adenoasociados (AAV)). Para dichos métodos de producción, pueden utilizarse las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35 en dicho método de una forma similar a las descritas para el Ad humano. Sin embargo, debido a las diferencias en las secuencias entre las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35, y las del Ad humano, el uso de las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35 minimiza en gran medida o elimina la posibilidad de una recombinación homóloga con funciones colaboradoras en célula hospedadora portadora de funciones E1 de un Ad humano, por ejemplo, las células 293, que pueden producir contaminantes adenovíricos infecciosos durante la producción del rAAV.

Los métodos para la producción del rAAV mediante el uso de las funciones colaboradoras adenovíricas han sido ampliamente descritos en la bibliografía con serotipos adenovíricos humanos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.258.595 y las referencias mencionadas 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. También pueden usarse estos métodos en la producción de un AAV de serotipo no humano, incluyendo serotipos de AAV de primates no humanos. Las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y del SAdV-35 que proporcionan las funciones colaboradoras necesarias (por ejemplo, los ORF6 E1a, E1b, E2a y/o E4) pueden ser particularmente útiles para proporcionar la necesaria función adenovírica mientras se minimiza o elimina la posibilidad de recombinación con cualquier otro adenovirus presente en la célula de empaquetamiento del rAAV que normalmente son de origen humano. Por lo tanto, pueden utilizarse los genes o los marcos abiertos de lectura seleccionados del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35 en estos métodos de producción de rAAV.

Alternativamente, en estos métodos pueden utilizarse vectores recombinantes basados en las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35. Dichos vectores adenovíricos de simio

recombinantes pueden incluir, por ejemplo, un híbrido Ad/AAV de chimpancé en el que las secuencias del Ad de chimpancé flanquean un casete de expresión del rAAV formado, por ejemplo, por las ITR en 3' y/o en 5' del AAV y un transgen bajo el control de las secuencias reguladoras que controlan su expresión. El experto en la materia reconocerá que otros vectores adenovíricos de simio y/o las secuencias génicas del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 serán útiles para la producción de rAAV y de otros virus dependientes de un colaborador adenovírico.

En otra alternativa más se diseñan moléculas de ácidos nucleicos para la administración y la expresión de productos génicos adenovíricos seleccionados en una célula hospedadora para conseguir un efecto fisiológico deseado. Por ejemplo, puede administrarse una molécula de ácido nucleico que contiene las secuencias que codifican una proteína E1a del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 a un sujeto para su uso como tratamiento del cáncer. Opcionalmente, dicha molécula está formulada en un portador basado en lípidos y preferentemente se dirige a las células cancerosas. Dicha formulación puede combinarse con otros productos terapéuticos oncológicos (por ejemplo, cisplatino, taxol o similares). Otros usos más de las secuencias adenovíricas proporcionadas en el presente documento serán evidentes para el experto en la materia.

Además, el experto en la materia comprenderá fácilmente que las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 pueden ser fácilmente adaptadas para su uso en una diversidad de sistemas de vectores víricos y no víricos para la administración *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de moléculas terapéuticas e inmunógenas. Por ejemplo, pueden utilizarse las secuencias del Ad del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 de simio en una diversidad de sistemas de vectores rAd y no rAd. Dichos sistemas de vectores pueden incluir, por ejemplo, plásmidos, lentivirus, retrovirus, poxvirus, virus de la variolovacuna y sistemas víricos adenoasociados, entre otros. La selección de estos sistemas de vectores no es una limitación de la presente invención.

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

B. Proteínas adenovíricas del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35

Se proporcionan los productos génicos de los adenovirus SAdV-28, SAdV-27, SAdV-29, SAdV-32, SAdV-33 o SAdV-35, tales como proteínas, enzimas y fragmentos de las mismas, que están codificados por los ácidos nucleicos adenovíricos descritos en el presente documento. Adicionalmente están englobadas las proteínas, las enzimas y los fragmentos de las mismas del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35, que tienen las secuencias de aminoácidos codificadas por estas secuencias de ácidos nucleicos que son generadas mediante otros métodos. Dichas proteínas incluyen aquellas codificadas por los marcos abiertos de lectura identificados en la tabla anterior, las proteínas en la Tabla 2 (mostradas también en la Lista de Secuencias) y los fragmentos de los mismos de las proteínas y de los polipéptidos.

| TABLA 2 – SECUENCIAS DE PROTEÍNAS | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Regiones | | SAdV-28 SEQ ID NO: | SAdV-27 SEQ ID NO: | SAdV-29 SEQ ID NO: | SAdV-32 SEQ ID NO: | SAdV-33 SEQ ID NO: | SAdV-35 SEQ ID NO: |
| E1a | 13S | 30 | 68 | 95 | 131 | 163 | 195 |
| | 12S | | | | | | |
| | 9S | | | | | | |
| E1b | T/19K pequeño | 23 | 61 | 93 | 125 | 156 | 187 |
| | T/55K grande | 2 | 40 | 73 | 104 | 135 | 167 |
| | IX | 3 | 41 | 73 | 105 | 136 | 168 |
| L1 | 52/55D | 4 | 42 | 74 | 106 | 137 | 169 |
| | IIIa | 5 | 43 | 75 | 107 | 138 | 170 |
| L2 | Pentona | 6 | 44 | 76 | 108 | 139 | 171 |
| | VII | 7 | 45 | 77 | 109 | 140 | 172 |
| | V | 8 | 46 | 78 | 110 | 141 | 173 |
| | pX | 9 | 47 | 79 | 111 | 142 | 174 |
| L3 | VI | 10 | 48 | 80 | 112 | 143 | 175 |
| | Hexona | 11 | 49 | 81 | 113 | 144 | 176 |
| | Endoproteasa | 12 | 50 | 82 | 114 | 145 | 189 |

| TABLA 2 – SECUENCIAS DE PROTEÍNAS | | | | | | | |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Regiones | | SAdV-28 SEQ ID NO: | SAdV-27 SEQ ID NO: | SAdV-29 SEQ ID NO: | SAdV-32 SEQ ID NO: | SAdV-33 SEQ ID NO: | SAdV-35 SEQ ID NO: |
| L4 | 100 kD | 13 | 51 | 83 | 115 | 146 | 177 |
| | Homólogo de 33 kD | 32 | 70 | 97 | 133 | 165 | 197 |
| | 22 kD | 25 | 63 | 99 | 127 | 158 | 190 |
| | VIII | 14 | 52 | 84 | 116 | 147 | 178 |
| E3 | 12,5 k | 15 | 53 | 100 | 117 | 148 | 179 |
| | CR1-alfa | 26 | 64 | 85 | 128 | 159 | 191 |
| | gp19 K | 16 | 54 | 101 | 118 | 149 | 180 |
| | CR1-beta | 27 | 55 | 86 | 119 | 160 | 192 |
| | CR1-gamma | 17 | 56 | 87 | 120 | 150 | 181 |
| | CR1-delta | 18 | 57 | 88 | ----- | 151 | 182 |
| | RID-alfa | 19 | 65 | 89 | 121 | 152 | 183 |
| | RID-beta | 28 | 58 | 102 | 129 | 161 | 193 |
| | 14,7 K | 20 | 66 | 90 | 122 | 153 | 184 |
| L5 | Fibra | 21 | 59 | 91 | 123 | 154 | 185 |

Por lo tanto, en una alternativa, se proporcionan proteínas únicas del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35 que son sustancialmente puras, es decir, están exentas de otras proteínas víricas y proteicas. Preferiblemente, estas proteínas son homogéneas en al menos un 10 %, más preferentemente homogéneas en un 60 %, y lo más preferentemente homogéneas en un 95 %.

En una alternativa se proporcionan proteínas de la cápside derivadas de simio únicas. Según se usa en el presente documento, una proteína de la cápside derivada de simio incluye cualquier proteína de la cápside adenovírica que contenga una proteína de la cápside del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35 o un fragmento de la misma, como se ha definido anteriormente, incluyendo, sin limitación, proteínas de la cápside quiméricas, proteínas de fusión, proteínas de la cápside artificiales, proteínas de la cápside sintéticas y proteínas de la cápside recombinantes, sin limitación con respecto al medio para la generación de estas proteínas.

Adecuadamente, estas proteínas de la cápside derivadas de simio contienen una o más regiones del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35 o fragmentos de las mismas (por ejemplo, una hexona, una pentona, una fibra o un fragmento de las mismas) junto con regiones de la cápside o fragmentos de las mismas de diferentes serotipos adenovíricos, o proteínas o fragmentos de la cápside de simio modificados, según se describe en el presente documento. Una "modificación de una proteína de la cápside asociada con un tropismo alterado" según se usa en el presente documento, incluye una proteína de la cápside alterada, es decir, una pentona, una hexona o una región de la proteína de fibra, o un fragmento de las mismas, tal como el dominio knob de la región de fibra, o un polinucleótido que codifica las mismas, de forma que se altere la especificidad. La cápside derivada de simio puede construirse con uno o más de los Ad de simio de la invención o con otro serotipo de Ad que puede ser de origen humano o no humano. Dicho Ad puede ser obtenido a partir de una diversidad de fuentes que incluyen la ATCC, fuentes comerciales o académicas, o pueden obtenerse las secuencias del Ad a partir del GenBank o de otras fuentes adecuadas.

Se proporcionan las secuencias de aminoácidos de la proteína pentona del SAdV-28 (SEQ ID NO: 6), del SAdV-27 (SEQ ID NO: 44), del SAdV-29 (SEQ ID NO: 76), del SAdV-32 (SEQ ID NO: 108), del SAdV-33 (SEQ ID NO: 139) y del SAdV-35 (SEQ ID NO: 171). Adecuadamente, estas proteínas pentona, o fragmentos únicos de las mismas, pueden utilizarse con diversos fines. Algunos ejemplos de fragmentos adecuados incluyen la pentona que tiene truncamientos N-terminales y/o C-terminales de aproximadamente 50, 100, 150 o 200 aminoácidos, basados en la numeración de los aminoácidos proporcionada anteriormente y en las SEQ ID NO: 6, 44, 76, 108, 139 y 171, respectivamente. Otros fragmentos adecuados incluyen fragmentos internos más cortos, C-terminales o N-terminales. Además, la proteína pentona puede ser modificada para una diversidad de fines conocidos por los expertos en la materia.

También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de la proteína hexona del SAdV-28 [SEQ ID NO: 11], del SAdV-27 (SEQ ID NO: 49), del SAdV-29 (SEQ ID NO: 81), del SAdV-32 (SEQ ID NO: 113), del SAdV-33 (SEQ ID NO: 144) y del SAdV-35 (SEQ ID NO: 176). Adecuadamente, estas proteínas hexona, o fragmentos únicos de las mismas, pueden utilizarse para diversos fines. Algunos ejemplos de fragmentos adecuados incluyen la hexona que tiene truncamientos N-terminales y/o C-terminales de aproximadamente 50, 100, 150, 200, 300, 400 o 500 aminoácidos, basados en la numeración de los aminoácidos proporcionada anteriormente y en las SEQ ID NO: 11,

49, 81, 113, 144 o 176, respectivamente. Otros fragmentos adecuados incluyen fragmentos internos más cortos, C-terminales o N-terminales. Por ejemplo, un fragmento adecuado es la región de bucle (dominio) de la proteína hexona, denominada DE1 y FG1, o una región hipervariable de la misma. Dichos fragmentos incluyen las regiones que abarcan los residuos de aminoácidos desde aproximadamente el aminoácido 125 hasta el 443; desde aproximadamente el 138 hasta el 441, o fragmentos menores, tales como aquellos que abarcan desde aproximadamente el residuo 138 hasta el residuo 163; desde aproximadamente el 170 hasta aproximadamente el 176; desde aproximadamente el 195 hasta aproximadamente el 203; desde aproximadamente el 233 hasta aproximadamente el 246; desde aproximadamente el 253 hasta aproximadamente el 264; desde aproximadamente el 287 hasta aproximadamente el 297; y desde aproximadamente el 404 hasta aproximadamente el 430 de las proteínas hexonas de simio, con referencia a las SEQ ID NO: 11, 49, 81, 113, 144 o 176, respectivamente. Otros fragmentos adecuados pueden ser fácilmente identificados por el experto en la materia. Además, la proteína hexona puede ser modificada para una diversidad de fines conocidos por los expertos en la materia. Debido a que la proteína hexona es el determinante del serotipo de un adenovirus, dichas proteínas hexonas artificiales darían como resultado adenovirus con unos serotipos artificiales. También pueden construirse otras proteínas de la cápside artificiales mediante el uso de de las secuencias de la pentona del Ad de chimpancé y/o de las secuencias de la fibra de la invención y/o de fragmentos de las mismas.

En una alternativa puede generarse un adenovirus que tiene una proteína hexona alterada mediante la utilización de las secuencias de una proteína hexona del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35. Un método adecuado para alterar las proteínas hexonas se describe en la Patente de Estados Unidos 5.922.315. En este método se cambia al menos una región de bucle de la hexona del adenovirus por al menos una región de bucle de otro serotipo de adenovirus. Por lo tanto, al menos una región de bucle de dicha proteína hexona de adenovirus alterada es una región de bucle de la hexona del Ad de simio SAdV-28 (o como alternativa, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35). En una alternativa, una región de bucle de la proteína hexona del SAdV-28 (o como alternativa, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35) es sustituida por una región de bucle de otro serotipo de adenovirus. En otra alternativa, se usa la región de bucle de la hexona del SAdV-28 (o como alternativa, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35) para sustituir una región de bucle de otro serotipo de adenovirus. Los serotipos de adenovirus adecuados pueden seleccionarse fácilmente entre serotipos humanos y no humanos, según se describe en el presente documento. La selección de un serotipo adecuado no es una limitación de la presente invención. Otros usos más de las secuencias de la proteína hexona del SAdV-28 (o como alternativa, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 o del SAdV-35) serán fácilmente apreciables por los expertos en la materia.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fibra del SAdV-28 [SEQ ID NO: 21], del SAdV-27 [SEQ ID NO: 59], del SAdV-29 [SEQ ID NO: 91], del SAdV-32 [SEQ ID NO: 123], del SAdV-33 [SEQ ID NO: 154] o del SAdV-35 [SEQ ID NO: 185]. Adecuadamente, esta proteína de fibra, o fragmentos únicos de la misma, pueden ser utilizados para diversos fines. Un fragmento adecuado es la fibra knob, ubicada en las SEQ ID NO: 21, 59, 91, 123, 154 o 185. Algunos ejemplos de otros fragmentos adecuados incluyen la fibra que tiene truncamientos N-terminales y/o C-terminales de aproximadamente 50, 100, 150 o 200 aminoácidos, basados en la numeración de aminoácidos proporcionada en las SEQ ID NO: 21, 59, 91, 123, 154 o 185. Otros fragmentos adecuados más incluyen fragmentos internos. Además, la proteína de fibra puede ser modificada mediante el uso de una diversidad de técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Los fragmentos únicos de las proteínas del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 tienen al menos 8 aminoácidos de longitud. Sin embargo, pueden utilizarse fácilmente fragmentos de otras longitudes deseadas. Además, en el presente documento se proporcionan modificaciones que pueden ser introducidas para mejorar el rendimiento y/o la expresión de un producto génico del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35, por ejemplo, la construcción de una molécula de fusión en la que la totalidad o un fragmento del producto génico del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 está fusionado (tanto directamente como a través de un conector) con un compañero de fusión para mejorar. Otras modificaciones adecuadas incluyen, sin limitación, el truncamiento de una región codificante (por ejemplo, de una proteína o de una enzima) para eliminar una pre- o una pro-proteína habitualmente escindida y para proporcionar la proteína o la enzima madura, y/o la mutación de una región codificante para proporcionar un producto génico secretable. Otras modificaciones más serán fácilmente apreciables por el experto en la materia. Adicionalmente están englobadas las proteínas que tienen una identidad de al menos aproximadamente el 99 % con las proteínas del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 proporcionadas en el presente documento.

Según se describe en el presente documento, los vectores de la invención que contienen las proteínas adenovíricas de la cápside del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 son particularmente muy adecuados para su uso en las aplicaciones en las que los anticuerpos neutralizantes disminuyen la eficacia de otros vectores basados en el serotipo del Ad, así como de otros vectores víricos. Los vectores de rAd son particularmente ventajosos en la repetición de administraciones para la terapia génica de repetición o para el refuerzo de la respuesta inmunitaria (títulos de vacuna).

En ciertas circunstancias puede ser deseable el uso de uno o más de los productos génicos del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 (por ejemplo, de una proteína de la cápside o de un fragmento de la misma) para generar un anticuerpo. El término "un anticuerpo", según se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a un epítipo. Los anticuerpos pueden existir en diversas formas que incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlonales de alta afinidad, anticuerpos monoclonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes y anticuerpos humanizados. Dichos anticuerpos proceden de las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

Dichos anticuerpos pueden ser generados mediante el uso de cualquiera de los diversos métodos conocidos en la materia. Los anticuerpos adecuados pueden ser generados mediante técnicas convencionales bien conocidas, por ejemplo, la de Kohler y Milstein y las muchas modificaciones conocidas de la misma. De forma análoga se generan anticuerpos de título alto deseables mediante la aplicación de las técnicas recombinantes conocidas a los anticuerpos monoclonales o policlonales desarrollados contra estos antígenos [véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente PCT n° PCT/GB85/00392; la Publicación de Solicitud de Patente Británica n° GB2188638A; Amit et al., 1986 Science, 233: 747-753; Queen et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033; la Solicitud de Patente PCT n° PCT/WO9007861; y Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Huse et al., 1988a Science, 246: 1275-1281]. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser producidos mediante la manipulación de las regiones determinantes de la complementariedad de anticuerpos animales o humanos contra el antígeno de esta invención. 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 et al., 1999, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Bird et al., 1988, Science 242: 423-426. La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos anti-idiotípicos (Ab2) y anticuerpos anti-anti-idiotípicos (Ab3). Véase, por ejemplo, M. Wettendorff et al., "Modulation of anti-tumor immunity by anti-idiotypic antibodies" en Idiotypic Network and Diseases, ed. por J. Cerny y J. Hiernaux, 1990 J. Am. Soc. Microbiol., Washington DC: páginas 203-229]. Estos anticuerpos anti-idiotípicos y anti-anti-idiotípicos son producidos mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos anticuerpos pueden usarse para diversos fines, incluyendo métodos diagnósticos y clínicos, y kits.

En ciertas circunstancias puede ser deseable la introducción de un marcador o de una etiqueta detectable en un producto génico del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35, en un anticuerpo o en otra construcción. Según se usa en el presente documento, un marcador detectable es una molécula que es capaz, sola o después de la interacción con otra molécula, de proporcionar una señal detectable. Lo más deseable es que el marcador sea detectable visualmente, por ejemplo, mediante fluorescencia, para su uso inmediato en análisis inmunohistoquímicos o en microscopía inmunofluorescente. Por ejemplo, algunos marcadores adecuados incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), corifosfina-O (CPO) o colorantes en tándem, PE-cianina-5 (PC5) y PE-Rojo Texas (ECD). Todos estos colorantes fluorescentes están disponibles en el mercado, y sus usos son conocidos en la técnica. Otros marcadores útiles incluyen un marcador de oro coloidal. Otros marcadores útiles más incluyen compuestos o elementos radioactivos. Adicionalmente, los marcadores incluyen una diversidad de sistemas enzimáticos que operan para revelar una señal colorimétrica en un ensayo, por ejemplo, la oxidasa de glucosa (que utiliza glucosa como sustrato) libera peróxido como producto que, en presencia de peroxidasa y de un donante de hidrógeno tal como tetrametil benzidina (TMB), produce TMB oxidada que se observa como un color azul. Otros ejemplos incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP) y hexocinasa junto con deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato que reacciona con el ATP, la glucosa y el NAD⁺ para producir, entre otros productos, NADH, que es detectado como un aumento en la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

Otros sistemas de marcaje que se utilizan en los métodos descritos en el presente documento son detectables mediante otros medios, por ejemplo, se usan micropartículas de látex coloreadas [Bangs Laboratories, Indiana] en las que se incluye un colorante en lugar de enzimas para formar conjugados con las secuencias objetivo, para proporcionar una señal visual indicativa de la presencia del complejo resultante en los ensayos aplicables.

Los métodos para el acoplamiento o la asociación del marcador con una molécula deseada son similarmente convencionales y conocidos por los expertos en la materia. Se describen métodos conocidos para la unión de marcadores [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 de los métodos de acoplamiento no limita esta invención.

Las secuencias, las proteínas y los fragmentos del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 pueden ser producidos mediante cualquier medio adecuado, incluyendo una producción recombinante, una síntesis química u otros medios sintéticos. Las técnicas de producción adecuadas son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY). Alternativamente, también pueden sintetizarse péptidos mediante métodos 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) páginas 27-62). Estos y

otros métodos de producción adecuados están en el conocimiento de los expertos en la materia y no son una limitación de la presente invención.

Además, el experto en la materia comprenderá fácilmente que las secuencias del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 pueden adaptarse con facilidad para su uso en una diversidad de sistemas de vectores víricos y no víricos para la administración *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* de moléculas terapéuticas e inmunógenas. Por ejemplo, en una alternativa se usan las proteínas de la cápside del Ad de simio y otras proteínas de adenovirus de simio descritas en el presente documento para la administración no vírica basada en proteínas de genes, de proteínas y de otras moléculas diagnósticas, terapéuticas e inmunógenas deseables. En dicha alternativa se une una proteína de la invención, directa o indirectamente, a una molécula para su direccionamiento a las células con un receptor para adenovirus. Preferiblemente, para dicho direccionamiento se selecciona una proteína de la cápside tal como una hexona, un pentona, una fibra o un fragmento de las mismas que tiene un ligando para un receptor de la superficie celular. Las moléculas adecuadas para su administración se seleccionan entre las moléculas terapéuticas descritas en el presente documento y sus productos génicos. Como conectores puede utilizarse una diversidad de conectores que incluyen lípidos, poliLys, y similares. Por ejemplo, la proteína pentona de simio puede utilizarse fácilmente para dicho fin mediante la producción de una proteína de fusión mediante el uso de las secuencias de la pentona de simio de una manera análoga a la descrita en Medina-Kauwe LK, et al., Gene Ther. Mayo de 2001; 8 (10): 795-803 y en Medina-Kauwe LK, et al., Gene Ther. Diciembre de 2001; 8 (23): 1753-1761. Alternativamente, pueden utilizarse las secuencias de aminoácidos de la proteína IX del Ad de simio para el direccionamiento de vectores a un receptor de la superficie celular, según se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20010047081. Algunos ligandos adecuados incluyen un antígeno CD40, una secuencia que contiene RGD o que contiene polilisina, y similares. Otras proteínas de Ad de simio más, incluyendo, por ejemplo, la proteína hexona y/o la proteína de fibra, pueden usarse para estos fines y similares.

Otras proteínas adenovíricas más del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 pueden usarse, solas o junto con otra proteína adenovírica, para diversos fines que serán fácilmente apreciables por el experto en la materia. Además, otros usos más para las proteínas adenovíricas del SAdV-28 serán fácilmente apreciables por el experto en la materia.

II. Los vectores adenovíricos recombinantes

Las composiciones descritas en el presente documento incluyen vectores que administran una molécula heteróloga a las células, tanto con fines terapéuticos como de vacuna. Según se usa en el presente documento, un vector puede incluir cualquier elemento genético, incluyendo, sin limitación, ADN desnudo, un fago, un transposón, un cósmido, un episoma, un plásmido o un virus. Dichos vectores contienen ADN de adenovirus de simio del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 y un minigen. Por "minigen" o "casete de expresión" se entiende la combinación de un gen heterólogo seleccionado y de los demás elementos reguladores necesarios para dirigir la traducción, la transcripción y/o la expresión del producto génico en una célula hospedadora.

Normalmente, un vector adenovírico derivado del SAdV se diseña de tal forma que el minigen esté ubicado en una molécula de ácido nucleico que contiene otras secuencias adenovíricas en la región nativa de un gen adenovírico seleccionado. El minigen puede ser insertado en una región génica existente para disrumpir la función de esa región, si se desea. Alternativamente, el minigen puede ser insertado en el sitio de un gen adenovírico parcial o completamente deleciónado. Por ejemplo, el minigen puede estar ubicado en un sitio tal como el sitio de una deleción funcional E1 o de una deleción funcional E3, entre otras que pueden ser seleccionadas. El término "deleciónado funcionalmente" o "deleción funcional" significa que se elimina una cantidad suficiente de la región del gen o se daña de otro modo, por ejemplo, mediante una mutación o una modificación, de forma que la región del gen ya no es capaz de producir productos de expresión génica funcionales. Si se desea, puede eliminarse la totalidad de la región del gen. Otros sitios adecuados para una disrupción o una deleción génica son analizados en cualquier parte de la solicitud.

Por ejemplo, para un vector de producción útil para la generación de un virus recombinante, el vector puede contener el minigen y bien el extremo 5' del genoma adenovírico o bien el extremo 3' del genoma adenovírico, o ambos extremos 5' y 3' del genoma adenovírico. El extremo 5' del genoma adenovírico contiene los elementos en cis en 5' necesarios para el empaquetamiento y la replicación; es decir, las secuencias de repetición terminal invertida en 5' (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 del Ad lineales y los elementos potenciadores para el promotor E1). El extremo 3' del genoma adenovírico incluye los elementos en cis en 3' (incluyendo las ITR) necesarios para el empaquetamiento y la encapsidación. Adecuadamente, un adenovirus recombinante contiene ambos elementos adenovíricos en cis en 5' y en 3', y el minigen está ubicado entre las secuencias adenovíricas en 5' y en 3'. Un vector adenovírico basado en el SAdV-28, en el SAdV-27, en el SAdV-29, en el SAdV-32, en el SAdV-33 y/o en el SAdV-35 también puede contener secuencias adenovíricas adicionales.

Adecuadamente, estos vectores adenovíricos basados en el SAdV-28, en el SAdV-27, en el SAdV-29, en el SAdV-32, en el SAdV-33 y/o en el SAdV-35 contienen uno o más elementos adenovíricos derivados del genoma adenovírico. En una alternativa, los vectores contienen las ITR adenovíricas del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 y secuencias adenovíricas adicionales del mismo serotipo de adenovirus. En otra alternativa, los vectores contienen las secuencias adenovíricas que derivan de un serotipo de adenovirus diferente al que proporciona las ITR.

Según se define en el presente documento, 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, pueden construirse adenovirus quiméricos o híbridos mediante el uso de los adenovirus descritos en el presente documento mediante el uso de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, el documento US 7.291.498.

La selección de la fuente adenovírica de las ITR y de la fuente de cualquier otra secuencia adenovírica presente en el vector no es una limitación de la presente invención. Hay disponible una diversidad de cepas de adenovirus en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, o disponible bajo demanda en una diversidad de fuentes comerciales e institucionales. Además, las secuencias de muchas de dichas cepas están disponibles en una diversidad de base de datos que incluyen, por ejemplo, PubMed y GenBank. En la bibliografía publicada se describen vectores de adenovirus homólogos preparados a partir de otros adenovirus de simio o de humano [véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 5.240.846]. Las secuencias de ADN de diversos tipos de adenovirus están disponibles en el GenBank, incluyendo el tipo Ad5 [nº de registro del GenBank M73260]. Las secuencias de los adenovirus pueden obtenerse a partir de cualquier serotipo de adenovirus conocido, tal como los serotipos 2, 3, 4, 7, 12 y 40, y que incluyen adicionalmente cualquiera de los tipos humanos actualmente identificados. De forma análoga también pueden emplearse adenovirus que se sabe que infectan a animales no humanos (por ejemplo, a simios) en las construcciones de vector de esta invención. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos nº 6.083.716.

Las secuencias víricas, los virus colaboradores (si fueran necesarios) y las partículas víricas recombinantes, y los demás componentes y secuencias del vector empleados en la construcción de los vectores descritos en el presente documento, se obtienen como se ha descrito anteriormente. Las secuencias de ADN del adenovirus de simio SAdV28 de la invención se emplean para la construcción de vectores y de líneas celulares útiles en la preparación de dichos vectores.

Pueden generarse modificaciones en las secuencias de ácidos nucleicos que forman los vectores descritos en el presente documento, incluyendo deleciones, inserciones y otras mutaciones en la secuencia, mediante el uso de las técnicas de biología molecular habituales, y también son de interés.

A. El "minigen"

Los métodos empleados para la selección del transgen, la clonación y la construcción del "minigen", y su inserción en el vector vírico, están en la pericia de la técnica, dadas las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

1. El transgen

El transgen es una secuencia de ácidos nucleicos, heteróloga de las secuencias del vector que flanquean el transgen, que codifica un polipéptido, una proteína u otro producto de interés. La secuencia codificante del ácido nucleico está unida operativamente a los componentes reguladores de una forma que permite la transcripción, la traducción y/o la expresión del transgen en una célula hospedadora.

La composición de la secuencia del transgen dependerá del uso que se le dará al vector resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia del transgen incluye una secuencia indicadora, que tras su expresión produce una señal detectable. Dichas secuencias indicadoras incluyen, sin limitación, secuencias de ADN que codifican la β -lactamasa, la β -galactosidasa (LacZ), la fosfatasa alcalina, la cinasa de timidina, la proteína fluorescente verde (GFP), la acetiltransferasa de cloranfenicol (CAT), la luciferasa, las proteínas unidas a la membrana, incluyendo, por ejemplo, la CD2, la CD4, la CD8, la proteína hemaglutinina de la gripe, y otras bien conocidas en la materia, contra las que existen o pueden ser producidos anticuerpos de alta afinidad mediante medios convencionales, y proteínas de fusión que comprenden una proteína unida a la membrana apropiadamente fusionada con un dominio de etiqueta de antígeno de, entre otras, la hemaglutinina o la Myc. Cuando estas secuencias codificantes están asociadas con los elementos reguladores que dirigen su expresión, proporcionan señales detectables mediante medios convencionales que incluyen ensayos enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescencia u otros en ensayos espectrográficos, ensayos de clasificación de células activadas por fluorescencia y ensayos inmunológicos, incluyendo un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) y una inmunohistoquímica. Por ejemplo, cuando la secuencia marcadora es el gen LacZ, la presencia del vector portador de la señal es detectada mediante ensayos de actividad de beta-galactosidasa. Cuando el transgen es el de la GFP

o la luciferasa, el vector portador de la señal puede medirse visualmente mediante la producción de color o de luz con un luminómetro.

5 En una realización, el transgen es una secuencia no marcadora que codifica un producto que es útil en biología y en medicina, tal como proteínas, péptidos, ARN, enzimas o ARN catalíticos. Algunas moléculas de ARN deseables incluyen ARNt, ARNbc, ARN ribosómico, ARN catalíticos y ARN antisentido. Un ejemplo de una secuencia de ARN útil es una secuencia que extingue la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo en el animal tratado.

10 El transgen puede usarse para el tratamiento de, por ejemplo, deficiencias genéticas, como una terapia o una vacuna contra el cáncer, para la inducción de una respuesta inmunitaria y/o con fines profilácticos de vacuna. Según se usa en el presente documento, la inducción de una respuesta inmunitaria se refiere a la capacidad de una molécula (por ejemplo, de un producto génico) de inducir una respuesta inmunitaria y/o humoral en los linfocitos T frente a la molécula. La invención incluye adicionalmente el uso de múltiples transgenes, por ejemplo, para corregir o mejorar una afección causada por una proteína multi-subunidad. En ciertas situaciones puede usarse un transgen 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. Con objeto de que la célula produzca la proteína multi-subunidad, se infecta una célula con el virus recombinante que contiene cada una de las diferentes subunidades. Alternativamente, las diferentes subunidades de una proteína pueden estar codificadas por el mismo transgen. En este caso, un único transgen incluye el ADN que codifica cada una de las subunidades, estando el ADN de cada subunidad separado por un sitio interno de entrada de 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 post-traducciona. Véase, por ejemplo, M. L. Donnelly, et al., J. Gen. Virol., 78 (Pt 1): 13-21 (enero de 1997); Furler, S., et al., Gene Ther., 8 (11): 864-873 (junio de 2001); Klump H., et al., Gene Ther., 8 (10): 811-817 (mayo de 2001). Este péptido 2A es significativamente menor que un IRES, lo que lo hace muy apropiado para su uso cuando el espacio es un factor limitante. Sin embargo, el transgen seleccionado puede codificar cualquier producto activo biológicamente u otro producto, por ejemplo, un producto deseable para un estudio.

30 Los transgenes adecuados pueden ser fácilmente seleccionados por el experto en la materia. La selección del transgen no se considera una limitación de esta realización.

35 2. Elementos reguladores

Además de los elementos principales identificados anteriormente para el minigen, el vector también incluye los elementos de control convencionales necesarios que están unidos operativamente al transgen de una forma que permita su transcripción, su traducción y/o su expresión en una célula transfectada con el vector de plásmido o infectada con el virus producido por la invención. Según se usa en el presente documento, las secuencias "unidas operativamente" incluyen secuencias tanto de control de la expresión que son contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en *trans* o a distancia para controlar el gen de interés.

45 Las secuencias de control de expresión incluyen las apropiadas secuencias de inicio de la transcripción, de terminación, promotoras y potenciadoras; señales de procesado eficiente del ARN tales como señales de empalme y de poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficacia de la traducción (es decir, secuencias consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción del producto codificado.

50 En la materia se conoce y puede utilizarse un gran número de secuencias de control de la expresión, incluyendo promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos tisulares. Algunos ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor del virus del sarcoma de Rous retrovírico (RSV) LTR (opcionalmente con el potenciador del RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador del CMV) [véase, por ejemplo, Boshart et al., Cell, 41: 521-530 (1985)], el promotor del SV40, el promotor de la reductasa de dihidrofolato, el promotor de la actina β , el promotor de la cinasa de fosfoglicerol (PGK) y el promotor EF1 α [Invitrogen].

60 Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden ser regulados mediante compuestos suministrados de forma exógena, factores ambientales tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, una fase aguda, un estado de diferenciación en particular de la célula o únicamente en células en replicación. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles en diversas fuentes comerciales que incluyen, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito otros muchos sistemas y pueden ser fácilmente seleccionados por el experto en la materia. Por ejemplo, algunos promotores inducibles incluyen el promotor de la metalotionina (MT) de oveja inducible con cinc y el promotor del virus del tumor de mama de ratón (MMTV) inducible con dexametasona (Dex). Otros sistemas inducibles incluyen el sistema promotor de la polimerasa T7 [documento WO 98/10088]; el promotor de insecto de la ecdisona [No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351 (1996)], un sistema reprimible con tetraciclina [Gossen et al., Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 89: 5547-5551 (1992)], un sistema inducible con tetraciclina [Gossen et al., Science, 268: 1766-1769 (1995), véase también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2: 512-518 (1998)]. Otros sistemas incluyen el dímero FK506, VP16 o p65 mediante el uso de castradiol, difenol murislerona, el sistema inducible con RU486 [Wang et al., Nat. Biotech., 15: 239-243 (1997) y Wang et al., Gene Ther., 4: 432-441 (1997)] y el sistema inducible con rapamicina [Magari et al., J. Clin. Invest., 100: 2865-2872 (1997)]. La eficacia de algunos promotores inducibles aumenta con el tiempo. En dichos casos se puede mejorar la eficacia de dichos sistemas mediante la inserción de múltiples represores en tándem, por ejemplo, TetR unido a TetR mediante un IRES. Alternativamente, se pueden esperar al menos 3 días antes del cribado de la función deseada. Se puede mejorar la expresión de las proteínas deseadas mediante medios conocidos para mejorar la eficacia del sistema. Por ejemplo, mediante el uso del elemento regulador post-transcripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck (WPRE).

En otra realización se usará el promotor nativo del transgen. El promotor nativo puede ser preferido cuando se desea que la expresión del transgen mimetice la expresión nativa. El promotor nativo puede usarse cuando la expresión del transgen debe ser regulada de forma temporal o con el desarrollo, de una forma específica según el tejido o en respuesta a un estímulo transcripcional específico. En una realización adicional también pueden usarse otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos mejoradores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak para mimetizar la expresión nativa.

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

Opcionalmente, los vectores portadores de transgenes que codifican productos terapéuticamente útiles o inmunógenos también pueden incluir marcadores seleccionables o genes indicadores pueden incluir secuencias que codifican la resistencia a la geneticina, a la higromicina o a la purimicina, entre otras. Dichos genes indicadores o marcadores seleccionables (ubicados preferentemente fuera del genoma vírico para ser empaquetados en una partícula vírica) pueden usarse para señalar la presencia de los plásmidos en las células bacterianas, tal como la resistencia a la ampicilina. Otros componentes del vector pueden incluir un origen de replicación. La selección de estos y de otros promotores y elementos del vector son convencionales y hay disponibles muchas otras de dichas secuencias [véase, por ejemplo, Sambrook et al., y las referencias mencionadas en el mismo].

Estos vectores son generados mediante el uso de las técnicas y las secuencias proporcionadas en el presente documento, junto con las técnicas conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas incluyen técnicas de clonación convencionales del ADNc tales como las descritas en los textos [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY], el uso de secuencias de oligonucleótidos solapantes de los genomas del adenovirus, una reacción en cadena de la polimerasa y cualquier método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada.

III. Producción del vector vírico

En una realización, se usan los plásmidos adenovíricos de simio (u otros vectores) para la producción de vectores adenovíricos. En una realización, los vectores adenovíricos son partículas adenovíricas que tienen una replicación defectuosa. En una realización, la replicación defectuosa de las partículas adenovíricas se consigue mediante deleciones en los genes E1a y/o E1b. Alternativamente, la replicación defectuosa en los adenovirus se consigue mediante otro medio, conservando opcionalmente los genes E1a y/o E1b. Los vectores adenovíricos también pueden contener otras mutaciones en el genoma adenovírico, por ejemplo, mutaciones sensibles a la temperatura o deleciones en otros genes. En otras realizaciones, es deseable conservar una región E1a y/o E1b intacta en los vectores adenovíricos. Dicha región E1 intacta puede estar ubicada en su localización nativa en el genoma adenovírico o colocada en el sitio de una deleción del genoma adenovírico nativo (por ejemplo, en la región E3).

En la construcción de vectores adenovíricos de simio útiles para la administración de un gen a una célula humana (o de otro mamífero), puede emplearse un amplio abanico de secuencias de ácidos nucleicos adenovíricas en los vectores. Por ejemplo, puede eliminarse la totalidad o una porción del gen temprano retardado del adenovirus E3 en la secuencia del adenovirus de simio que forma parte del virus recombinante. Se cree que la función del E3 de simio es irrelevante para la función y la producción de las partículas del virus recombinante. Los vectores adenovíricos de simio también pueden construirse 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, la totalidad de la región E4. Otro vector más de esta invención contiene una delección en el gen temprano retardado E2a. Las delecciones también pueden realizarse en cualquiera de los genes tardíos L1 hasta L5 del genoma del adenovirus de simio. De forma análoga, las delecciones en los genes intermedios IX y IVa2 pueden ser útiles para ciertos fines. Pueden realizarse otras delecciones en otros genes adenovíricos estructurales o no estructurales. Las delecciones analizadas anteriormente pueden usarse de forma individual, es decir, una secuencia adenovírica para su uso según se describe en el presente documento puede contener delecciones en una única región individual. Alternativamente, pueden usarse delecciones de genes completos o de porciones de los mismos eficaces para destruir su actividad biológica, en cualquier combinación. Por ejemplo, en un ejemplo de vector, la secuencia adenovírica puede tener delecciones de los genes E1 y 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 la delección del E3, y así sucesivamente. Como se ha analizado anteriormente, dichas delecciones pueden usarse junto con otras mutaciones, tales como mutaciones sensibles a la temperatura, para conseguir un resultado deseado.

Puede cultivarse un vector adenovírico que carezca de cualquier secuencia adenovírica esencial (por ejemplo, E1a, E1b, E2a, E2b, E4 ORF6, L1, L2, L3, L4 y L5) en presencia de los productos génicos adenovíricos ausentes, que son necesarios para la infectividad vírica y la propagación de una partícula adenovírica. Estas funciones colaboradoras pueden ser proporcionadas mediante el cultivo del vector adenovírico en presencia de una o más construcciones colaboradoras (por ejemplo, un plásmido o un virus) o por una célula hospedadora 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 colaboradores

Por lo tanto, dependiendo del contenido del gen del adenovirus de simio de los vectores víricos empleados para portar el minigen, puede ser necesario un adenovirus colaborador o un fragmento vírico no replicante para proporcionar las suficientes secuencias génicas del adenovirus de simio necesarias para producir una partícula vírica recombinante infecciosa que contenga el minigen. Los virus colaboradores útiles contienen secuencias génicas del adenovirus seleccionadas que no están presentes en la construcción del vector del adenovirus y/o que no son expresadas por la línea celular de empaquetamiento en la que es transfectedo el vector. En una realización, el virus colaborador tiene una replicación defectuosa y contiene diversos genes del adenovirus además de las secuencias descritas anteriormente. Dicho virus colaborador se usa deseablemente junto con una línea celular de expresión de E1.

Los virus colaboradores también pueden formarse en conjugados de policación según se describe en Wu et al., J. Biol. Chem., 264: 16985-16987 (1989); K. J. Fisher y J. M. Wilson, Biochem. J., 299: 49 (1 de abril de 1994). El virus colaborador puede contener opcionalmente un segundo minigen indicador. Varios de dichos genes indicadores son conocidos en la técnica. La presencia de un gen indicador en el virus colaborador que es diferente del transgen del vector adenovírico permite monitorizar independientemente el vector Ad y el virus colaborador. Este segundo indicador se usa para permitir la separación entre el virus recombinante resultante y el virus colaborador después de la purificación.

2. Líneas celulares complementarias

Para la generación de adenovirus de simios (Ad) recombinantes con cualquiera de los genes delecionados descritos anteriormente, la función de la región génica delecionada, si es esencial para la replicación y la infectividad del virus, debe ser aportada al virus recombinante por un virus colaborador o una línea celular, es decir, una línea celular de empaquetamiento o complementaria. En muchas circunstancias puede usarse una línea celular que expresa el E1 humano para transcomplementar el vector Ad de chimpancé. Esto es particularmente ventajoso porque, debido a la diversidad entre las secuencias Ad de chimpancé de la invención y las secuencias AdE1 humanas que se encuentran en las células de empaquetamiento disponibles actualmente, el uso de las actuales células que contienen el E1 humano previene la generación de adenovirus con una replicación competente durante el proceso de replicación y de producción. Sin embargo, en ciertas circunstancias, será deseable la utilización de una línea celular que exprese los productos génicos E1 y que pueda ser utilizada para la producción de un adenovirus de simio con el E1 delecionado. Dichas líneas celulares han sido descritas. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 6.083.716.

Si se desea, se pueden utilizar las secuencias proporcionadas en el presente documento para generar una célula o una línea celular de empaquetamiento que exprese, como mínimo, el gen E1 del adenovirus del SAdV28 bajo el control transcripcional de un promotor para su expresión en una línea celular parental seleccionada. Para este fin pueden emplearse promotores inducibles o constitutivos. Algunos ejemplos de dichos promotores se describen con detalle en cualquier parte de esta memoria descriptiva. Se selecciona una célula parental para la generación de una nueva línea celular que exprese cualquier gen del SAdV28 deseado. Sin limitación, dicha línea celular parental puede ser de células HeLa [nº de registro de la ATCC CCL 2], A549 [nº de registro de la ATCC CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo, Detroit 510, CCL 72] y WI-38 [CCL 75], entre otras. Todas estas líneas celulares están disponibles en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas celulares parentales adecuadas pueden obtenerse en otras fuentes.

Dichas líneas celulares que expresan el E1 son útiles en la generación de vectores recombinantes de adenovirus de simio con el E1 deleciónado. Adicionalmente, o como alternativa, pueden construirse líneas celulares que expresen uno o más productos génicos adenovíricos de simio, por ejemplo, E1a, E1b, E2a, y/o E4 ORF6, mediante el uso esencialmente de los mismos procedimientos que los usados en la generación de los vectores víricos recombinantes de simio. Dichas líneas celulares pueden ser utilizadas para transcomplementar vectores de adenovirus con los genes esenciales deleciónados que codifican para esos productos, o para proporcionar las funciones colaboradoras necesarias para el empaquetamiento de un virus dependiente de un colaborador (por ejemplo, de virus adenoasociados). La preparación de una célula hospedadora implica técnicas tales como el ensamblaje de las secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede llevarse a cabo mediante la utilización de las técnicas convencionales. Dichas técnicas incluyen la clonación de ADNc y genómico, que son bien conocidas y se describen en Sambrook et al., mencionado anteriormente, el uso de secuencias de oligonucleótidos solapantes de los genomas del adenovirus, combinado con una reacción en cadena de la polimerasa, métodos sintéticos y cualquier otro método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada.

En otra alternativa más se proporcionan los productos génicos adenovíricos esenciales en *trans* por parte del vector adenovírico o y/o del virus colaborador. En dicho caso puede seleccionarse una célula hospedadora adecuada entre cualquier organismo biológico, incluyendo células procariontas (por ejemplo, bacterias) y células eucariotas, incluyendo células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Las células hospedadoras particularmente deseables se seleccionan entre cualquier especie de mamífero, incluyendo, sin limitación, células tales como células A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, HEK 293 o PERC6 (ambas de las cuales expresan el E1 adenovírico funcional) [Fallaux, FJ et al., (1998), Hum Gene Ther, 9: 1909-1917], Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblastos primarios, hepatocitos y mioblastos derivados de mamíferos que incluyen seres humanos, mono, ratón, rata, conejo y hámster. La selección de la especie de mamífero que proporcione las células no es una limitación de esta invención; ni tampoco lo es el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral, etc.

3. Ensamblaje de la partícula vírica y transfección de una línea celular

Generalmente, cuando se administra el vector que comprende el minigen mediante una transfección, el vector es administrado en una cantidad de desde aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 100 µg de ADN, y preferentemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 µg de ADN y desde aproximadamente 1×10^4 células hasta aproximadamente 1×10^{13} células, y preferentemente hasta aproximadamente 10^5 células. Sin embargo, las cantidades relativas del ADN del vector con respecto a las células hospedadoras pueden ajustarse teniendo en consideración factores tales como el vector seleccionado, el método de administración y las células hospedadoras seleccionadas.

El vector puede ser cualquier vector conocido en la materia o divulgado anteriormente, incluyendo ADN desnudo, un plásmido, un fago, un transposón, cósmidos, episomas, virus, etc. La introducción en la célula hospedadora del vector puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la materia o según se ha divulgado anteriormente, incluyendo una transfección y una infección. Uno o más de los genes adenovíricos pueden ser integrados de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, expresados de forma estable en forma de episomas, o expresados de forma temporal. Todos los productos génicos pueden ser expresados de forma temporal, en un episoma o integrados de forma estable, o algunos de los productos génicos pueden ser expresados de forma estable mientras que otros son expresados de forma temporal. Adicionalmente, los promotores de cada uno de los genes adenovíricos pueden ser seleccionados independientemente entre un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor nativo adenovírico. Los promotores pueden estar regulados por un estado fisiológico específico del organismo o de la célula (es decir, por un estado de diferenciación o células en replicación o quiescentes) o por factores añadidos de forma exógena, por ejemplo.

La introducción de las moléculas (en forma de plásmidos o de virus) en la célula hospedadora también puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas conocidas por el artesano experto y según se analiza lo largo de la memoria descriptiva. En las realizaciones preferidas, se usan las técnicas de transfección habituales, por ejemplo, una transfección con CaPO_4 o una electroporación.

El ensamblaje de las secuencias de ADN seleccionadas del adenovirus (así como del transgen y de otros elementos del vector en diversos plásmidos intermedios, y el uso de los plásmidos y de los vectores para producir una partícula vírica recombinante, se consiguen, todos, mediante el uso de técnicas convencionales. Dichas técnicas incluyen las técnicas de clonación convencionales del ADNc tales como las descritas en los textos [Sambrook et al., mencionado anteriormente], el uso de secuencias de oligonucleótidos solapantes de los genomas del adenovirus, una reacción en cadena de la polimerasa, y cualquier método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada. Se emplean técnicas de transfección y de cotransfección habituales, por ejemplo, técnicas de precipitación con CaPO_4 . Otros métodos convencionales empleados incluyen una recombinación homóloga de los genomas víricos, el cultivo de los virus en una capa de agar, métodos para medir la generación de la señal, y similares.

Por ejemplo, después de la construcción y el ensamblaje del vector vírico que contiene el minigen deseado, el vector es transfectado *in vitro* en presencia de un virus colaborador en la línea celular de empaquetamiento. Se produce una recombinación homóloga entre las secuencias del colaborador y del vector, que permite que las secuencias

transgénicas del adenovirus del vector sean replicadas y empaquetadas en cápsides de viriones, dando como resultado las partículas del vector vírico recombinante. El método actual para la producción de dichas partículas víricas está basado en la transfección. Sin embargo, la invención no está limitada a dichos métodos.

5 Estos adenovirus de simio recombinantes resultantes son útiles en la transferencia de un transgen seleccionado a una célula seleccionada. En los experimentos *in vivo* con el virus recombinante cultivado en las líneas celulares de empaquetamiento, los vectores adenovíricos recombinantes de simio con el E1 delecionado de la invención muestran utilidad en la transferencia de un transgen a una célula que no es de simio, preferentemente de un ser humano.

10 IV. Uso de los vectores adenovíricos recombinantes

Los vectores recombinantes basados en el SAdV-28, en el SAdV-27, en el SAdV-29, en el SAdV-32, en el SAdV-33 y/o en el SAdV-35 son útiles para la transferencia génica a un paciente humano o veterinario no simio *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

Los vectores adenovíricos 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 deleción E1 pueden ser transfectados en una línea celular que expresa el E1 como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, pueden usarse adenovirus de replicación competente en otra línea celular seleccionada. Las células transfectadas se cultivan después de la forma convencional, permitiendo que el adenovirus recombinante exprese el producto génico a partir del promotor. Después, el producto génico puede ser recuperado del medio de cultivo mediante los métodos convencionales conocidos de aislamiento y recuperación de proteínas a partir de un cultivo.

Un vector adenovírico recombinante de simio derivado del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 proporciona un vehículo de transferencia génica eficaz que puede administrar un transgen seleccionado a una célula hospedadora seleccionada *in vivo* o *ex vivo* incluso cuando el organismo tiene anticuerpos neutralizantes contra uno o más serotipos del AAV. En una alternativa, el rAAV y las células se mezclan *ex vivo*; las células infectadas se cultivan mediante el uso de las metodologías convencionales; y las células transducidas son reinfundidas al paciente. Estas composiciones son particularmente adecuadas para la administración de genes para fines terapéuticos y para una inmunización, incluyendo la inducción de una inmunidad protectora.

Más habitualmente, los vectores adenovíricos recombinantes del SAdV28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 se utilizarán para la administración de moléculas terapéuticas o inmunógenas, como se describe a continuación. Para más aplicaciones se comprenderá fácilmente que los vectores adenovíricos recombinantes son particularmente adecuados para su uso en regímenes que implican la administración repetida de vectores adenovíricos recombinantes. Dichos regímenes implican normalmente la administración de una serie de vectores víricos en los que las cápsides víricas están alternadas. Las cápsides víricas pueden ser modificadas en cada administración posterior, o después de un número preseleccionado de administraciones de una cápside de un serotipo en particular (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o más). Por lo tanto, un régimen puede implicar la administración de un rAd con una primera cápside de simio, la administración de un rAd con una segunda cápside de simio, y la administración con una tercera cápside de simio. Una diversidad de otros regímenes que usan las cápsides Ad solas, una junto con otra o junto con otros adenovirus (que preferentemente no son reactivos cruzados inmunológicamente) serán evidentes para los expertos en la materia. Opcionalmente, dicho régimen puede implicar la administración de los rAd con cápsides de otros adenovirus de primates no humanos, de adenovirus humanos o de secuencias artificiales tales como las que se describen en el presente documento. Cada fase del régimen puede implicar la administración de una serie de inyecciones (o de otras vías de administración) con una única cápside de Ad seguida de en una serie con otra cápside de una fuente de Ad diferente. Alternativamente, los vectores del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 pueden ser utilizados en regímenes que implican otros sistemas de administración no mediados por adenovirus, que incluyen otros sistemas víricos, sistemas de administración no víricos, proteína, péptidos y otras moléculas biológicamente activas.

Las siguientes secciones se centrarán en ejemplos de moléculas que pueden ser administradas a través de los vectores adenovíricos de la invención.

A. Administración mediada por Ad de moléculas terapéuticas

En una alternativa, los vectores recombinantes descritos anteriormente son administrados a seres humanos según los métodos publicados para una terapia génica. Un vector vírico de simio portador del transgen seleccionado puede ser administrado a un paciente, preferentemente suspendido en una solución biológicamente compatible o en un vehículo de administración farmacéuticamente aceptable. Un vehículo adecuado incluye solución salina estéril. Para este fin pueden emplearse otras soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas conocidas por ser portadores farmacéuticamente aceptables y bien conocidas por los expertos en la materia.

Los vectores adenovíricos de simio son administrados en unas cantidades suficientes para transducir las células objetivo y para proporcionar unos niveles suficientes de transferencia y expresión génica para proporcionar un beneficio terapéutico sin unos excesivos efectos adversos fisiológicos médicamente aceptables, que pueden ser determinados por los expertos en el arte médico. Las vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, una administración directa en la retina y otros métodos de administración intraocular, la administración directa en el hígado, la inhalación, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, rectal, oral y otras vías de administración parenterales. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea, o ajustarse dependiendo del transgen o de la afección. La vía de administración dependerá principalmente de la naturaleza de la afección que se va a tratar.

Las dosis del vector vírico dependerán principalmente de factores tales como la afección que se va a tratar, la edad, el peso y la salud del paciente, y por lo tanto pueden variar dependiendo del paciente. Por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz para un ser humano adulto o veterinaria del vector vírico está generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 100 μ l hasta aproximadamente 100 ml de un portador que contiene unas concentraciones de desde aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{15} partículas, de desde aproximadamente 1×10^{11} hasta 1×10^{13} partículas, o de desde aproximadamente 1×10^9 hasta 1×10^{12} partículas de virus. Las dosis variarán dependiendo del tamaño del animal y de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis adecuada humana o veterinaria (para un animal de aproximadamente 80 kg) para una inyección intramuscular está en el intervalo de desde aproximadamente 1×10^9 hasta aproximadamente 5×10^{12} partículas por ml, para un único sitio. Opcionalmente pueden administrarse en múltiples sitios de administración. En otro ejemplo, una dosis adecuada humana o veterinaria puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 1×10^{11} hasta aproximadamente 1×10^{15} partículas para una formulación oral. El experto en la materia puede ajustar estas dosis dependiendo de la vía de administración y de la aplicación terapéutica o de vacuna para la cual se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión del transgen, o para un inmunógeno, el nivel de anticuerpo en circulación, pueden ser monitorizados para determinar la frecuencia de administración de la dosis. Otros métodos más para la determinación de la cronología de la frecuencia de administración serán evidentes para el experto en la materia.

Una etapa opcional del método implica la administración conjunta al paciente, ya sea conjuntamente, o antes o después de la administración del vector vírico, de una cantidad adecuada de un inmunomodulador de acción corta. El inmunomodulador seleccionado se define en el presente documento como un agente capaz de inhibir la formación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el vector recombinante de esta invención o capaz de inhibir la eliminación por parte de los linfocitos T citolíticos (CTL) del vector. El inmunomodulador puede interferir con las interacciones entre los subconjuntos de linfocitos T colaboradores (T_m o $TH2$) y los linfocitos B para inhibir la formación de anticuerpos neutralizantes. Alternativamente, el inmunomodulador puede inhibir la interacción entre los linfocitos T_m y los CTL para reducir la aparición de la eliminación por parte de los CTL del vector. Una diversidad de inmunomoduladores útiles y las dosis de uso de los mismos se divulgan, por ejemplo, en Yang et al., J. Virol., 70 (9) (septiembre de 1996); en la Solicitud de Patente Internacional nº WO96/12406, publicada el 2 de mayo de 1996; y en la Solicitud de Patente Internacional nº PCT/US96/03035.

1. Transgenes terapéuticos

Los productos terapéuticos útiles codificados por el transgen incluyen hormonas y factores de crecimiento y de diferenciación que incluyen, sin limitación, insulina, glucagón, hormona del crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de la hormona de crecimiento (GRF), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de las colonias de granulocitos (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento ácido de fibroblastos (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante (TGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I e IGF-II), un factor cualquiera de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes, incluyendo TGF, activinas, inhibinas o cualquiera de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), las BMP 1-15, uno cualquiera de la familia de los factores de crecimiento heregluina/neuregulina/ARIA/factor de diferenciación neu (NDF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas celulares 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 e hidroxilasa de tirosina.

Otros productos transgénicos incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario que incluyen, sin limitación, citocinas y linfocinas tales como trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL) desde la IL-1 hasta la IL-25 (incluyendo, por ejemplo, la IL-2, la IL-4, la IL-12 y la IL-18), proteína quimioattractora de monocitos, factor inhibidor de la leucemia, factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral e interferones, y factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitación, las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única, receptores de los linfocitos T, receptores de los linfocitos T quiméricos, receptores de los linfocitos T de cadena única, moléculas del MHC de la clase I y de la clase II, así como inmunoglobulinas y moléculas del MHC modificadas genéticamente.

Algunos productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras del complemento, tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína del cofactor de membrana (MCP), factor acelerador de la degradación (DAF), CR1, CF2 y CD59.

5 Otros productos génicos útiles más incluyen uno cualquiera de los receptores de hormonas, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. La invención engloba 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 densidad muy baja (VLDL) y el receptor de captadores. La invención también incluye productos génicos tales como miembros de la superfamilia de los
10 receptores de hormonas esteroideas, incluyendo los receptores de glucocorticoides y los receptores de estrógenos, los receptores de la vitamina D y otros receptores nucleares. Además, algunos productos génicos útiles incluyen factores de transcripción tales como *jun*, *fos*, *max*, *mad*, factores de respuesta séricos (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 se unen a la caja CCAAT, factor de regulación del interferón (IRF-1), proteína tumoral de Wilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas que se unen a la caja GATA, por ejemplo, GATA-3, y la familia *forkhead* de proteínas en hélice con alas.

Otros productos génicos útiles incluyen, sintetasa de carbamoilo I, transcarbamilasa de ornitina, sintetasa de arginosuccinato, liasa de arginosuccinato, arginasa, hidrolasa de fumarilacetato, hidroxilasa de fenilalanina, alfa-
20 1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, desaminasa de porfobilinógeno, factor VIII, factor IX, beta-sintasa de cistación, descarboxilasa de cetoácido de cadena ramificada, albúmina, deshidrogenasa de isovaleril-coA, carboxilasa de propionil CoA, mutasa de metil malonil CoA, deshidrogenasa de glutaril CoA, insulina, beta-glucosidasa, carboxilato piruvato, fosforilasa hepática, cinasa fosforilasa, descarboxilasa de glicina, proteína H, proteína T, una secuencia reguladora transmembranaria de la fibrosis quística (CFTR) y una secuencia del ADNc de la distrofina.

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

La reducción y/o la modulación de la expresión de un gen son particularmente deseables para el tratamiento de afecciones hiperproliferativas caracterizadas por células hiperproliferativas, como son los cánceres y la psoriasis. Los polipéptidos objetivo incluyen aquellos polipéptidos que son producidos que exclusivamente o a mayores niveles
35 en las células hiperproliferativas en comparación con las células normales. Los antígenos objetivo incluyen los 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 oncogénicos como antígenos objetivo, los polipéptidos objetivo para tratamientos antineoplásicos y regímenes protectores incluyen las regiones variables de los anticuerpos creados por los linfomas de linfocitos B y las regiones variables de los receptores de los linfocitos T de los linfomas de linfocitos T que, en algunas realizaciones, también se usan como antígenos objetivo en la enfermedad autoinmune. Otros polipéptidos asociados a tumores pueden usarse como polipéptidos objetivo, tales como los polipéptidos que se encuentran con mayores niveles en las células tumorales, incluyendo el polipéptido reconocido por el anticuerpo monoclonal 17-1A y los polipéptidos de unión al folato.

45 Otros polipéptidos y proteínas terapéuticas adecuados incluyen aquellos que pueden ser útiles para el tratamiento de individuos que padecen enfermedades y trastornos autoinmunes, al conferir una amplia respuesta protectora basada en la inmunidad frente a los objetivos que están asociados con una autoinmunidad, incluyendo receptores celulares y células que producen auto-anticuerpos. Algunas enfermedades autoinmunes mediadas por los linfocitos T incluyen artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), síndrome de Sjogren, sarcoidosis, diabetes sacarina dependiente de insulina (IDDM), 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 está caracterizada por los receptores de los linfocitos T (TCR) que se unen a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con las enfermedades autoinmunes.

55 Los vectores adenovíricos de simio de la invención son particularmente adecuados para regímenes terapéuticos en los que se desean múltiples administraciones de transgenes mediadas por adenovirus, por ejemplo, en regímenes que implican la readministración del mismo transgen o en regímenes de combinación que implican la administración de otros transgenes. Dichos regímenes pueden implicar la administración de un vector adenovírico del SAdV28 de simio, seguido de la readministración con un vector del mismo serotipo de adenovirus. Los regímenes particularmente deseables implican la administración de un vector adenovírico del SAdV28 de simio, en los que la fuente de las secuencias de la cápside adenovírica del vector administrado en la primera administración difiere de la fuente de las secuencias de la cápside adenovírica del vector vírico utilizado en una o más de las administraciones posteriores. Por ejemplo, un régimen terapéutico implica la administración de un vector del SAdV28 y la repetición de la administración con uno o más vectores adenovíricos del mismo serotipo o de uno diferente. En otro ejemplo,
60 un régimen terapéutico implica la administración de un vector adenovírico seguida de la repetición de la administración con un vector del SAdV28 que tiene una cápside que difiere de la fuente de la cápside del primer

vector adenovirico administrado, y opcionalmente la administraci3n adicional con otro vector que es el mismo o, preferentemente, que difiere de la fuente de la c3pside adenovirica del vector de las etapas de administraci3n previas. Estos regimenes no est3n limitados a la administraci3n de los vectores adenoviricos construidos mediante el uso de las secuencias del SAdV28 de simio. M3s bien, estos regimenes pueden utilizar f3cilmente otras secuencias adenoviricas que incluyen, sin limitaci3n, otras secuencias adenoviricas de simio, (por ejemplo, Pan9 o C68, C1, etc.), otras secuencias adenoviricas de un primate no humano o secuencias adenoviricas humanas, junto con uno o m3s de los vectores del SAdV28. Algunos ejemplos de dichos serotipos adenoviricos de simio, de otro primate no humano y humanos se analizan en cualquier parte de este documento. Adem3s, estos regimenes terap3uticos pueden implicar la administraci3n simult3nea o secuencial de vectores adenoviricos del SAdV28 junto con vectores no adenoviricos, vectores no v3ricos y/o una diversidad de otros compuestos o mol3culas terap3uticamente 3tiles. La invenci3n no est3 limitada a estos regimenes terap3uticos, una variedad de los cuales ser3 f3cilmente apreciada por el experto en la materia.

B. Administraci3n mediada por Ad de transgenes inmun3genos

Los vectores recombinantes del SAdV-28 tambi3n pueden emplearse como composiciones inmun3genas. Seg3n se usa en el presente documento, una composici3n inmun3gena es una composici3n frente a la cual se crea una respuesta humoral (por ejemplo, anticuerpo) o celular (por ejemplo, un linfocito T citot3xico) frente a un producto transg3nico administrado por la composici3n inmun3gena despu3s de su administraci3n a un mam3fero, y preferentemente a un primate. Un Ad recombinante de simio puede contener, en cualquiera de sus delecciones de la secuencia del adenovirus, un gen que codifica un inmun3geno deseado. Es probable que el adenovirus de simio sea m3s adecuado para su uso en forma de una vacuna de un virus recombinante vivo en diferentes especies animales en comparaci3n con un adenovirus de origen humano, pero no se limita a dicho uso. Los adenovirus recombinantes pueden usarse en vacunas profil3cticas o terap3uticas frente a cualquier pat3geno para el cual se ha(n) identificado el (los) ant3geno(s) crucial(es) para la inducci3n de una respuesta inmunitaria y es capaz de limitar la diseminaci3n del pat3geno, y para el cual est3 disponible el ADNc.

Dichas composiciones de vacuna (u otras inmun3genas) se formulan en un veh3culo de administraci3n adecuado, como se ha descrito anteriormente. Generalmente, las dosis de las composiciones inmun3genas est3n en el intervalo definido anteriormente para las composiciones terap3uticas. Los niveles de inmunidad del gen seleccionado pueden ser monitorizados para determinar la necesidad, si la hubiera, de refuerzos. Despu3s de la evaluaci3n de los t3tulos del anticuerpo en el suero, pueden desearse inmunizaciones de refuerzo adicionales.

Opcionalmente, una composici3n de vacuna de la invenci3n puede formularse para que contenga otros componentes que incluyen, por ejemplo, adyuvantes, estabilizantes, ajustadores del pH, conservantes y similares. Dichos componentes son bien conocidos por los expertos en el arte de las vacunas. Algunos ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, sin limitaci3n, liposomas, alumbre, monofosforil l3pido A y cualquier factor biol3gicamente activo, tal como una citocina, una interleucina, una quimiocina, un ligando y, 3ptimamente, combinaciones de los mismos. Algunos de estos factores biol3gicamente activos pueden ser expresados *in vivo*, por ejemplo, a trav3s de un pl3smido o de un vector v3rico. Por ejemplo, dicho adyuvante puede ser administrado con una vacuna de ADN de sensibilizaci3n que codifica un ant3geno para mejorar la respuesta inmunitaria espec3fica frente al ant3geno en comparaci3n con la respuesta inmunitaria generada tras la sensibilizaci3n con una vacuna de ADN que codifica 3nicamente el ant3geno.

Los adenovirus recombinantes son administrados en "una cantidad que inmun3gena", es decir, una cantidad de adenovirus recombinante que es eficaz, a trav3s de una v3a de administraci3n, para transfectar las c3lulas deseadas y proporcionar unos niveles de expresi3n suficientes del gen seleccionado como para inducir una respuesta inmunitaria. Cuando se proporciona una inmunidad protectora, los adenovirus recombinantes se consideran composiciones de vacuna 3tiles en la prevenci3n de la infecci3n y/o de una enfermedad recurrente.

Alternativamente, o adem3s, los vectores de la invenci3n pueden contener un transgen que codifica un p3ptido, un polip3ptido o una prote3na que induce una respuesta inmunitaria frente a un inmun3geno seleccionado. Se espera que los vectores recombinantes del SAdV-28, del AdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 sean muy eficaces en la inducci3n de los linfocitos T citol3cticos y de los anticuerpos frente a la prote3na antig3nica heter3loga insertada expresada por el vector.

Por ejemplo, los inmun3genos pueden seleccionarse entre una diversidad de familias de virus. Algunos ejemplos de familias de virus frente a los cuales ser3 deseable una respuesta inmunitaria incluyen, la familia de picornavirus, que incluye los g3neros de rinovirus, que son responsables de aproximadamente el 50 % de los casos de resfriado com3n; los g3neros de enterovirus, que incluyen poliovirus, coxsackievirus, ecovirus y enterovirus humanos tales como el virus de la hepatitis A; y los g3neros de aphovirus, que son responsables de enfermedades de los pies y la boca, principalmente en animales no humanos. En la familia de virus de los picornavirus, algunos ant3genos objetivo incluyen la VP1, la VP2, la VP3, la VP4 y la VPG. Otra familia de virus incluye la familia de los calcivirus, que engloba el grupo de virus de Norwalk, que son un importante agente causal de gastroenteritis epid3micas. Otra familia v3rica m3s, deseable para su uso en el direccionamiento de ant3genos para la inducci3n de respuestas inmunitarias en humanos y en animales no humanos, es la familia de los togavirus, que incluye los g3neros alfavirus,

que incluyen el virus de Sindbis, el virus de Ross River y el virus de la encefalitis de Venezuela, equina oriental y occidental, y los rubivirus, incluyendo el virus de la rubéola. La familia flaviviridae incluye el virus del dengue, de la fiebre amarilla, de la encefalitis japonesa, de la encefalitis de San Luis y de la encefalitis transmitida por garrapatas. Otros antígenos objetivo pueden ser generados a partir de la familia de la Hepatitis C o de coronavirus, que incluyen

5 varios virus no humanos tales como el virus de la bronquitis infecciosa (aves), el virus porcino de transmisión gastroentérica (cerdos), el virus de la encefalomiélitis porcina hemaglutinante (cerdos), el virus de la peritonitis infecciosa felina (gatos), el coronavirus entérico felino (gatos), el coronavirus canino (perros) y el coronavirus respiratorio humano, que puede provocar el resfriado común y/o la hepatitis no A, B o C. En la familia de los coronavirus, algunos antígenos objetivo incluyen la glicoproteína E1 (también denominada M o proteína de la matriz), la E2 (también denominada S o proteína Spike), la E3 (también denominada HE o hemaglutina-elterosa) (no

10 presente en todos los coronavirus) o la N (nucleocápside). Otros antígenos más pueden ser dirigidos contra la familia de los rhabdovirus, que incluye los géneros vesiculovirus (por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular), y el lyssavirus general (por ejemplo, rabies).

15 En la familia de los rhabdovirus, los antígenos adecuados pueden derivar de la proteína G o de la proteína N. La familia de los filoviridae, que incluye virus de fiebres hemorrágicas tales como el virus de Marburg y de Ébola, puede ser una fuente adecuada de antígenos. La familia de los paramyxovirus incluye el virus paragripal de tipo 1, el virus paragripal de tipo 3, el virus paragripal bovino de tipo 3, el rubulavirus (el virus de la parotiditis), el virus paragripal de tipo 2, el virus paragripal de tipo 4, el virus de la enfermedad de Newcastle (pollos), la peste bovina, morbillivirus, que incluye sarampión y moquillo canino, y pneumovirus, que incluye el virus respiratorio sincitial. El virus de la gripe está clasificado en la familia ortomyxovirus y es una fuente adecuada de antígeno (por ejemplo, la proteína HA, la proteína NI). La familia de los bunyavirus incluye los géneros bunyavirus (encefalitis de California La Crosse), phlebovirus (fiebre del valle de Rift), hantavirus (puremala es un virus de la fiebre hemahagina), nairovirus (enfermedad de las ovejas de Nairobi) y otros diversos bingavirus sin clasificar. La familia de los arenavirus proporciona una fuente de antígenos frente al virus de la LCM y de la fiebre de Lassa. La familia de los reovirus incluye los géneros reovirus, rotavirus (que provoca una gastroenteritis aguda en niños), orbivirus y cultivirus (fiebre de las garrapatas de Colorado, Lebombo (seres humanos), encefalosis equina, lengua azul).

20

25

La familia de los retrovirus incluye la subfamilia oncorivirinal que engloba enfermedades humanas y veterinarias tales como el virus de la leucemia felina, el HTLVI y el HTLVII, la lentivirinal (que incluye el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la anemia infecciosa equina y spumavirinal). Entre los lentivirus se han descrito muchos antígenos adecuados y pueden ser seleccionados fácilmente. Algunos ejemplos de antígenos adecuados del VIH y del 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, algunos fragmentos adecuados de la proteína Env pueden incluir cualquiera de sus subunidades, tales como la gp120, la gp160, la gp41 o fragmentos menores de las mismas, por ejemplo, de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud. De forma análoga, pueden seleccionarse fragmentos de la proteína tat. [Véase la Patente de Estados Unidos 5.891.994 y la Patente de Estados Unidos 6.193.981.] Véanse también las proteínas del VIH y del VIS descritas en D. H. Barouch et al., J. Virol., 75 (5): 2462-2467 (marzo de 2001), y en R. R. Amara, et al., Science, 292: 69-74 (6 de abril de 2001). En otro ejemplo, pueden usarse las proteínas o los péptidos inmunógenos del VIH y/o del VIS para formar proteínas de fusión u otras moléculas inmunógenas. Véanse, por ejemplo, las proteínas de fusión VIH-1 Tat y/o Nef y los regímenes de inmunización descritos en el documento WO 01/54719, publicado el 2 de agosto de 2001, y en el documento WO 99/16884, publicado el 8 de abril de 1999. La invención no está limitada a las proteínas o los péptidos inmunógenos del VIH y/o del VIS descritos en el presente documento. Además, se han descrito diversas modificaciones de estas proteínas, o podrían ser realizadas fácilmente por el experto en la materia. Véase, por ejemplo, la proteína gag modificada que se describe en la Patente de Estados Unidos 5.972.596. Además, cualquier inmunógeno deseado del VIH y/o del VIS puede ser administrado solo o en combinación. Dichas combinaciones pueden incluir la expresión desde un único vector o desde múltiples vectores. Opcionalmente, otra combinación puede implicar la administración de uno o más inmunógenos expresados con la administración de uno o más de los inmunógenos en forma de una proteína. Dichas combinaciones se analizan con más detalle a continuación.

30

35

40

45

50

La familia de los papovavirus incluye la subfamilia de los poliomasvirus (los virus BKU y JCU) y la subfamilia de los papilomavirus (asociados con cánceres o con la progresión maligna de un papiloma). La familia de los adenovirus incluye virus (EX, AD7, ARD, O.B.) que causan enfermedades respiratorias y/o enteritis. La familia de los parvovirus de los parvovirus felinos (enteritis felina), de los panleucopeniavirus felinos, de los parvovirus caninos y de los parvovirus porcinos. La familia de los herpesvirus incluye la subfamilia de los alfaherpesvirinae, que engloba los géneros simplexvirus (HSVI, HSVII), varicelovirus (seudorrabia, varicela zoster) y la subfamilia beta herpesvirinae, que incluye los géneros citomegalovirus (HCMV, muromegalovirus) y la subfamilia gamma herpesvirinae, que incluye los géneros linfocriptovirus, EBV (linfoma de Burkitt), rinotraqueítis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek y rhabdovirus. La familia de los poxvirus incluye la subfamilia de los cordopoxvirinae, que engloba los géneros ortopoxvirus (Variola (viruela) y Vaccinia (viruela vacuna)), parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, y la subfamilia entomopoxvirinae. La familia de los hepadnavirus incluye el virus de la hepatitis B. Un virus no clasificado que puede ser una fuente adecuada de antígenos es el virus de la hepatitis delta. Otras fuentes víricas más pueden incluir el virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa de aves y el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino. La familia de los alfavirus incluye el virus de la arteritis y varios virus de encefalitis.

55

60

65

Algunos inmunógenos que son útiles para inmunizar a un ser humano o a un animal no humano frente a otros patógenos incluyen, por ejemplo, bacterias, hongos, microorganismos parásitos o parásitos multicelulares que infectan a vertebrados humanos y no humanos, o de una célula cancerosa o una célula tumoral. Algunos ejemplos de patógenos bacterianos incluyen cocos patógenos grampositivos que incluyen neumococos; estafilococos; y estreptococos. Algunos cocos patógenos gramnegativos incluyen meningococos; gonococos. Algunos bacilos entéricos patógenos gramnegativos incluyen enterobacteriaceae; pseudomonas, acinetobacteria y eikenella; melioidosis; salmonella; shigella; haemophilus; moraxella; *H. ducreyi* (que causa el chancroide); brucella; *Francisella tularensis* (que causa la tularemia); yersinia (pasteurella); streptobacillus moniliformis y spirillum; algunos bacilos grampositivos incluyen listeria monocytogenes; erysipelothrix rhusiopathiae; *Corynebacterium diphtheria* (difteria); colera; *B. anthracis* (ántrax); donovanosis (granuloma inguinal); y bartonellosis. Algunas enfermedades causadas por bacterias patógenas anaerobias incluyen el tétanos; el botulismo; otros clostridios; la tuberculosis; la lepra; y otras micobacterias. Algunas enfermedades patógenas por espiroquetas incluyen sífilis; treponematosi; pian, pinta y sífilis endémica; y leptospirosis. 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. Algunas infecciones por rickettsias incluyen la fiebre tifoidea, la fiebre moteada de las montañas rocosas, la fiebre Q y la rickettsiosis exantemática. Algunos ejemplos de infecciones por micoplasma y por clamidia incluyen: mycoplasma pneumoniae; linfogranuloma venéreo; psittacosis; e infecciones perinatales por clamidia. Algunos eucariotas patógenos engloban protozoos y helmintos patógenos y las infecciones producidas por los mismos incluyen: amebiasis; malaria; leishmaniosis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; babesiosis; giardiasis; triquinosis; filariasis; esquistosomiasis; nematodos; trematodos; e infecciones por cestodos (gusanos planos).

Muchos de estos organismos y/o las toxinas producidas por los mismos han sido identificados por los Centros de Control de Enfermedades [(CDC), Department of Health and Human Services, Estados Unidos], 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 víricas [filovirus (por ejemplo, Ébola, Marburg), y arenavirus [por ejemplo Lassa, Machupo]], todos los cuales están actualmente clasificados como agentes de la Categoría A; *Coxiella burnetti* (fiebre Q); especies de Brucella (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (melioidosis), *Ricinus communis* y su toxina (la toxina ricino), *Clostridium perfringens* y su toxina (la toxina épsilon), especies de *Staphylococcus* y sus toxinas (la enterotoxina B), *Chlamydia psittaci* (psittacosis), amenazas para la salubridad del agua (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*), fiebre tifoidea (*Richettsia powazekii*) y encefalitis víricas (alfavirus, por ejemplo, encefalitis equina de Venezuela; encefalitis equina oriental; encefalitis equina occidental); todos los cuales están actualmente clasificados como agentes de la Categoría B; y el virus de Nipán y los hantavirus, que actualmente están clasificados como agentes de la Categoría C. Además, otros organismos, que también están así clasificados o clasificados de una forma diferente, pueden ser identificados y/o usados para dichos fines en el futuro. Se comprenderá fácilmente que los vectores víricos y otras construcciones descritas en el presente documento son útiles para la administración de antígenos procedentes de estos organismos, de virus, de sus toxinas o de otros subproductos, que prevendrán y/o tratarán una infección u otra reacción adversa con estos agentes biológicos.

Se anticipa que la administración de los vectores del SAdV-28 para la administración de inmunógenos frente a la región variable de los linfocitos T desencadenará una respuesta inmunitaria que incluya a los CTL para la eliminación de esos linfocitos T. En la AR se han caracterizado varias regiones variables específicas de los TCR que están implicadas en la enfermedad. Estos TCR incluyen el V-3, el V-14, el V-17 y el V α -17. Por lo tanto, la administración de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos uno de estos polipéptidos desencadenará una respuesta inmunitaria que estará dirigida contra los linfocitos T implicados en la AR. En la EM, se han caracterizado varias regiones variables específicas de los TCR que están implicadas en la enfermedad. Estos TCR incluyen el V-7 y el V α -10. Por lo tanto, la administración de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos uno de estos polipéptidos desencadenará una respuesta inmunitaria que estará dirigida contra los linfocitos T implicados en la EM. En la esclerodermia se han caracterizado varias regiones variables específicas de los TCR que están implicadas en la enfermedad. Estos TCR incluyen el V-6, el V-8, el V-14 y el V α -16, el V α -3C, el V α -7, el V α -14, el V α -15, el V α -16, el V α -28 y el V α -12. Por lo tanto, la administración de un adenovirus recombinante de simio que codifica al menos uno de estos polipéptidos desencadenará una respuesta inmunitaria que estará dirigida contra los linfocitos T implicados en la esclerodermia.

C. Métodos de administración mediada por los Ad

Los niveles terapéuticos, o los niveles de inmunidad, del gen seleccionado pueden ser monitorizados para determinar la necesidad, si la hubiera, de refuerzos. Después de una evaluación de la respuesta de los linfocitos T CD8+, u opcionalmente, de los títulos del anticuerpo, en el suero, pueden desearse inmunizaciones de refuerzo opcionales. Opcionalmente, los vectores recombinantes del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 pueden ser administrados en una única administración o en varios regímenes de combinación, por ejemplo, junto con un régimen o un plan de tratamiento que implique otros principios activos, o en un régimen de sensibilización y refuerzo. En la materia se ha descrito una variedad de dichos regímenes y pueden

ser seleccionados con facilidad.

Por ejemplo, los regímenes de sensibilización y refuerzo pueden implicar la administración de un vector basado en ADN (por ejemplo, de un plásmido) para sensibilizar el sistema inmunitario frente a la segunda inmunización de refuerzo con un antígeno tradicional, tal como una proteína o un virus recombinante portador de las secuencias que codifican dicho antígeno. Véase, por ejemplo, el documento WO 00/11140, publicado el 2 de marzo de 2000. Alternativamente, un régimen de inmunización puede implicar la administración de un vector recombinante del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 para sensibilizar la respuesta inmunitaria frente a un vector (ya sea vírico o basado en ADN) portador de un antígeno, o a una proteína. En otra alternativa más, un régimen de inmunización implica la administración de una proteína seguida de un refuerzo con un vector que codifica el antígeno.

En una alternativa se describe un método de sensibilización y refuerzo de una respuesta inmunitaria frente a un antígeno seleccionado mediante la administración de un vector de plásmido de ADN portador de dicho antígeno, seguido del refuerzo con un vector recombinante del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35. En una alternativa, el régimen de sensibilización y refuerzo implica la expresión de multiproteínas del vehículo de sensibilización y/o de refuerzo. Véase, por ejemplo, R. R. Amara, Science, 292: 69-74 (6 de abril de 2001) que describe un régimen multiproteico para la expresión de subunidades de proteínas útiles para la generación de una respuesta inmunitaria frente al VIH y al VIS. Por ejemplo, una sensibilización con ADN puede administrar las Gag, Pol, Vif, VPX y Vpr, y las Env, Tat y Rev, a partir de un único transcrito. Alternativamente, las Gag y Pol del VIS, y la Env del VIH-1 son administradas en una construcción de adenovirus recombinante del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35. Otros regímenes más se describen en el documento WO 99/16884 y el documento WO 01/54719.

Sin embargo, los regímenes de sensibilización y refuerzo no se limitan a la inmunización frente al VIH o a la administración de estos antígenos. Por ejemplo, la sensibilización puede implicar la administración de un primer vector del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 seguida del 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 y refuerzo puede proporcionar una respuesta inmunitaria protectora frente al virus, las bacterias u otro organismo a partir del cual deriva el antígeno. En otro ejemplo, el régimen de sensibilización y refuerzo proporciona un efecto terapéutico que puede medirse mediante el uso de los ensayos convencionales para la detección de la presencia de la afección para la cual se está administrando la terapia.

La composición de sensibilización puede ser administrada en diversas zonas del cuerpo de una forma dependiente de la dosis, que depende del antígeno contra el que se está dirigiendo la respuesta inmunitaria deseada. La cantidad o el (los) sitio(s) de inyección o el portador farmacéutico no son una limitación. Más bien, el régimen puede implicar una etapa de sensibilización y/o una de refuerzo, cada una de las cuales puede incluir una única dosis que es administrada cada hora, cada día, cada semana, cada mes o cada año. Como ejemplo, los mamíferos pueden recibir una o dos dosis que contienen desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 50 µg del plásmido en un portador. Una cantidad deseable de una composición de ADN varía desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 10.000 µg del vector de ADN. Las dosis pueden variar desde aproximadamente 1 µg hasta 1.000 µg de ADN por kg de peso corporal del sujeto. La cantidad o el sitio de administración se selecciona deseablemente basándose en la identidad y el estado del mamífero.

En el presente documento se describe la unidad de dosificación del vector adecuada para la administración del antígeno al mamífero. El vector es preparado para su administración suspendiéndolo o disolviéndolo en un portador farmacéutica o fisiológicamente aceptable, tal como solución salina isotónica; soluciones salinas isotónicas u otras formulaciones que serán evidentes para los expertos en dicha administración. El portador apropiado será evidente para los expertos en la materia y dependerá en gran medida de la vía de administración. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser administradas a un mamífero según las rutas descritas anteriormente, en una formulación de liberación sostenida mediante el uso de un polímero biocompatible biodegradable, o mediante una administración en el sitio mediante el uso de micelas, geles y liposomas. Opcionalmente, la etapa de sensibilización también incluye la administración, junto con la composición de sensibilización, de una cantidad adecuada de adyuvante, tal como los que se definen en el presente documento.

Preferiblemente al sujeto mamífero se le administra una composición de refuerzo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 27 semanas después de la administración de la composición de sensibilización. La administración de la composición de refuerzo se lleva a cabo mediante el uso de una cantidad eficaz de una composición de refuerzo que contiene o es capaz de administrar el mismo antígeno que el administrado por la vacuna de sensibilización de ADN. La composición de refuerzo puede estar formada por un vector vírico recombinante derivado de la misma fuente vírica (por ejemplo, las secuencias adenovíricas de la invención) o de otra fuente. Alternativamente, la "composición de refuerzo" puede ser una composición que contenga el mismo antígeno que el codificado por la vacuna de sensibilización de ADN, pero en forma de una proteína o de un péptido, composición que induce una respuesta inmunitaria en el hospedador. En otra alternativa, 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 como los bien conocidos vectores bacterianos o víricos. Los

principales requisitos de la composición de refuerzo son que el antígeno de la composición sea el mismo antígeno que, o un antígeno con reactividad cruzada con, el codificado por la composición de sensibilización.

En otra realización, los vectores del SAdV-28 también son muy adecuados para su uso en una diversidad de otros regímenes de inmunización y terapéuticos. Dichos regímenes pueden implicar la administración de vectores del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 simultáneamente o secuencialmente con vectores Ad de diferentes serotipos de cápside, regímenes en los que los vectores del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 son administrados simultáneamente o secuencialmente con vectores no Ad, regímenes en los que los vectores del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 son administrados simultáneamente o secuencialmente con proteínas, péptidos y/u otros compuestos terapéuticos o inmunógenos biológicamente útiles. Dichos usos serán fácilmente apreciables por el experto en la materia.

Los siguientes ejemplos ilustran la clonación del SAdV-28, del SAdV-27, del SAdV-29, del SAdV-32, del SAdV-33 y/o del SAdV-35 y la construcción de los vectores recombinantes ejemplares del SAdV-28. Estos ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1 – Aislamiento de los adenovirus de simio

Se obtuvieron muestras de heces de la colonia chimpancé del University of Louisiana New Iberia Research Center, 4401 W. Admiral Doyle Drive, New Iberia, Louisiana, Estados Unidos, y de la colonia de chimpancé del Michael E. Keeling Center for Comparative Medicine and Research, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Bastrop, Texas, Estados Unidos. Los sobrenadantes de las muestras de heces de chimpancé en suspensión en solución salina equilibrada de Hanks se filtraron estériles 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 Ham F12 con un 10 % de FBS, un 1 % de penicilina-estreptomina y 50 µg/ml de gentamicina. Después de entre aproximadamente 1 y 2 semanas de cultivo, el efecto citopático visual (CPE) era evidente en los cultivos celulares con varios de los inóculos. Los adenovirus se purificaron a partir de los cultivos de las células A549 mediante el uso de técnicas estándar publicadas de gradiente de cloruro de cesio para la purificación de adenovirus. Se aisló el ADN de los adenovirus purificados y fue completamente secuenciado por Qiagen Genomic services, Hilden, Alemania.

Tomando como base el análisis filogenético de las secuencias de ADN víricas, se determinó que los adenovirus indicados, que eran el adenovirus de simio 27 (SAdV-27), el adenovirus de simio 28 (SAdV-28), el adenovirus de simio 29 (SAdV-29), el adenovirus de simio 32 (SAdV-32), el adenovirus de simio 33, (SAdV-33) y el adenovirus de simio 35 (SAdV-35), estaban en el mismo subgrupo que el subgrupo B humano.

La metodología usada para la creación de los vectores era crear en primer lugar un clon molecular del plásmido bacteriano de la totalidad del vector adenovírico con el E1 deleciónado, seguido de la transfección del ADN del plásmido en la línea celular complementaria del E1 HEK 293 para rescatar el vector vírico.

Con objeto de crear clones moleculares de un vector adenovírico con el E1 deleciónado, en primer lugar se crearon los clones moleculares del plásmido de los adenovirus con el E1 deleciónado 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 deleción E1. Los casetes de expresión flanqueados por I-CeuI y PI-SceI, y escindidos mediante el uso de estas enzimas de restricción, se ligaron en los clones de plásmidos adenovíricos con el E1 deleciónado. El clon molecular adenovírico del plásmido portador del casete de expresión deseado en lugar de la deleción del E1 fue transfectado en las células HEK 293 para rescatar los vectores adenovíricos recombinantes. Se encontró que el rescate posterior a la transfección estaba facilitado si en primer lugar se liberaba el genoma adenovírico lineal del plásmido mediante una digestión con enzimas de restricción.

Ejemplo 2 - Construcción de clones moleculares de plásmido con el E1 deleciónado basados en los adenovirus de simio del Subgrupo B 27, 28, 29, 32, 33 y 35 para facilitar la derivación de los vectores adenovíricos recombinantes con el E1 deleciónado

Debido a que tanto los informes publicados como la experiencia de los inventores con el AdC1 (el SAdV-21) ha indicado que las deleciones del E1 en los adenovirus del subgrupo B no son complementadas por los genes Ad5 E1 en las células HEK 293, se construyeron vectores basados en las especies B de adenovirus SAdV-27, SAdV-28, SAdV-29, SAdV-32 y SAdV-35, basándose en la estrategia descrita previamente de construcción de vectores adenovíricos híbridos mediante el uso de AdC1 [Roy et al., J Virol. Methods. (2007) 141, 14-21; Roy et al., J Gen Virol. (2006) 87, 2477-2485], en los que los extremos izquierdo y derecho de una construcción quimérica derivan del adenovirus de chimpancé Pan 5 (también conocido como el adenovirus de simio 22).

El plásmido de partida para la construcción de los vectores adenovíricos del subgrupo B era uno que había sido construido en un intermedio de la construcción del vector quimérico AdC1 - pPan5C1de1RI, según se describe en el documento WO 2005/001103 A3, publicado el 6 de enero de 2005. El plásmido pPan5C1de1 RI porta los genomas de los adenovirus quiméricos con el E1 deleciónado Pan 5 (SAdV-22) y Ad C1 (SAdV-21) que ha sido deleciónado

internamente entre los sitios de restricción EcoRI. Adicionalmente, están presentes los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción de corte raro I-CeuI y P1-SceI en lugar de la delección E1 para facilitar una fácil inserción de los casetes del transgen.

- 5 A. Construcción de un clon molecular de plásmido con el E1 delecionado basado en el SAdV-27, mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular

Debido a que tanto los informes publicados como la experiencia de los inventores con el AdC1 han indicado que las delecciones del E1 en los adenovirus del subgrupo B no son complementadas por los genes Ad5 E1 en las células HEK 293, se generó un adenovirus híbrido basándose en una estrategia mediante el uso del AdC1 [Roy et al., J Virol. Methods. (2007) 141, 14-21; Roy et al., J Gen Virol. (2006) 87, 2477-2485], en el que los extremos izquierdo y derecho de una construcción quimérica derivan del adenovirus de chimpancé Pan 5 (también conocido como el adenovirus de simio 22).

- 15 1. Inserción del conector

El segmento Ad C1 del pPan5C1de1 RI (entre ClaI y EcoRI) fue sustituido por un conector de ADN creado mediante la hibridación de los oligómeros SAD27 top y SAD27 bot. SEQ ID NO: 198: SAD27 top - CGCGCCGAGCATTCATGCTTGTACGTACCCACGCACAGCTTTAAACATTTG y SEQ ID NO: 199: SAD27 bot - AATTCAAATGTTTAAAGCTGTGCGTGGGTACGTACAAGCATGAATGCTCGG. Este plásmido es el pC5endsSAD27 oligo.

2. PCR

25 El plásmido pC5endsSAD27 oligo fue digerido con Ascl y EcoRI y en él se clonó un fragmento generado mediante una PCR de 3873 pb (digerido también con Ascl y EcoRI), para crear el pC5endsSAD27PCR. El fragmento de la PCR fue generado mediante el uso del ADN vírico del SAdV-27 como molde, mediante el uso de los cebadores SAD27 Asc y SAD27 RI mediante el uso del kit de PCR NEB Phusion, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores de la PCR contenían los sitios Ascl y EcoRI, respectivamente.

30 SEQ ID NO: 200: SAD27 Asc - TACCACCAGCGGCGCGCCAGACATCAAG
SEQ ID NO: 201: SAD27 RI - AAATGGAATTCAAATGTTTAAAGCTGTG

- 35 3. Inserción del fragmento Ascl (7951 - 17458) del SAdV-27

El plásmido pC5endsSAD27PCR fue digerido con Ascl y en él se clonó el fragmento de ADN vírico del SAdV-27 Ascl (7951 - 17458) fragmento de 9507 pb. El clon con la orientación correcta se denominó pC5SAD27 PCR Asc.

- 40 4. Inserción del fragmento PacI (18409 - 29019)

El plásmido pC5SAD27 PCR Asc fue digerido con PacI y en él se clonó el fragmento de ADN vírico del SAdV-27 PacI (18409 - 29019) de 10610 pb. El clon con la orientación correcta se denominó pC5C27delAsc-Pac.

- 45 5. Inserción del fragmento MluI (16026) - SbfI (23007).

El plásmido pC5C27delAsc-Pac fue digerido con MluI + SbfI y en él se clonó el fragmento de ADN vírico del SAdV-27 MluI (16026) - SbfI (23007) de 6981 pb para crear el pC5/C27 IP.

50 El plásmido pC5/C27 IP porta un ADN vírico (SAdV-22) con el E1 delecionado Ad Pan 5 en el que un segmento interno de 25603 pb (pb nº 7955 - pb nº 33557) ha sido sustituido por un segmento análogo funcional de 24753 pb (pb nº 7951 - pb nº 32703) del SAdV-27, es decir, esto da como resultado la sustitución de los genes del SAdV-22 para la proteína pre-terminal, la proteína 52/55K, la base pentona, la pVII, el Mu, la hexona, la endoproteasa, la proteína de unión al ADN, la proteína de soporte de 100 K, la proteína de 33 K, la pVIII, la región E3 y la fibra, por los del SAdV-27. El sitio Ascl en el extremo izquierdo del fragmento del SAdV-27 está en el comienzo del marco abierto de lectura de la polimerasa de ADN (el residuo 236 de la proteína de 1192 residuos) y da como resultado una proteína quimérica. El sitio EcoRI, que constituye el extremo derecho del fragmento del SAdV-27 está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la E4. El extremo derecho se ligó a un fragmento terminal derecho generado mediante una PCR del Ad Pan 5, de forma que el producto de la traducción regenerado del orf 6/7 de la E4 sea quimérico entre el Ad Pan 5 y el SAdV-27.

- 60 B. Construcción de un clon molecular de plásmido con el E1 delecionado basado en el SAdV-28, mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular

Debido a que tanto los informes publicados como la experiencia de los inventores con el AdC1 han indicado que las delecciones E1 en los adenovirus del subgrupo B no son complementadas por los genes Ad5 E1 en las células HEK 293, se generó un adenovirus híbrido basándose en una estrategia mediante el uso del AdC1 [Roy et al., J Virol.

Methods. (2007) 141, 14-21; Roy et al., J Gen Virol. (2006) 87, 2477-2485], en el que los extremos izquierdo y derecho de una construcción quimérica derivan del adenovirus de chimpancé Pan 5 (también conocido como el adenovirus de simio 22).

5 El plásmido de partida era uno que había sido construido en un intermedio de la construcción del vector quimérico AdC1 - pPan5C1de1 RI, según se describe en el documento WO 2005/001103 A3, publicado el 6 de enero de 2005.

1. PCR

10 El segmento Ad C1 del pPan5C1de1 RI (entre Clal y EcoRI) fue sustituido por un fragmento generado mediante una PCR mediante el uso del ADN vírico del SAdV-28 como molde. Los cebadores de la PCR contienen los sitios Clal y EcoRI respectivamente. Se usaron los cebadores CCATCTATCGATGCATAATCAGCAAACC [SEQ ID NO: 33, (W33 directo, Tm – 64,5 °)] y CTCAAATGGAATTCAAATGTTTAAAG [SEQ ID NO: 34]. El cebador 'W33 directo' contiene el sitio Clal (subrayado). Las dos bases que siguen al sitio Clal son CA en la secuencia natural, pero se han cambiado por GC en el cebador para convertir el sitio Clal en uno que no esté metilado en las bacterias. Este cambio altera un aminoácido - S94C - en la proteína E3 de 106 aminoácidos que es homóloga de la supuesta proteína del Ad4 CR1 delta de 11 K). El cebador 'W33 inverso' contiene el sitio EcoRI (subrayado). La correspondiente secuencia natural del Ad es GAATCC. La base cambiada está en un codón para la isoleucina (residuo 123 del orf 6/7 de la proteína E4) que no se ve alterada por este cambio. El sitio Clal es el mismo que el que está en el 30273 del SAdV-28; se creó el sitio EcoRI en el cebador de forma que su empalme con la región E4 del Ad Pan 5 crea un orf 6/7 de la E4 quimérico (el sitio EcoRI del pPan5C1de1RI está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la proteína E4 del Ad Pan 5).

25 Se llevó a cabo una PCR mediante el uso de la polimerasa NEB Phusion y de los tampones proporcionados por el fabricante.

30 El producto de 2474 pb fue digerido con EcoRI y Clal y clonado en pBluescript II SK+ entre los dos mismos sitios para producir el pBS W33 PCR. El plásmido pBS W33 PCR fue digerido con Clal y EcoRI y el fragmento (originalmente) de 2453 pb derivado de la PCR se clonó en pPan5C1de1RI entre los dos mismos sitios para producir el pPan5C1de1RI -W33 PCR.

2. Inserción del fragmento Ascl (11065) en Clal (18577) (entre el sitio Ascl presente en el gen pol y el único sitio Clal)

35 El plásmido pPan5C1de1RI-W33 PCR fue digerido con Ascl y Clal y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-28 Ascl (11065) en Clal (18577) (entre el sitio Ascl presente en el gen pol y el único sitio Clal), para producir el pPan5-W33 delAsc delCla.

3. Inserción del fragmento Ascl (7941) en Ascl (11065) (para crear un gen de la polimerasa quimérico)

40 El plásmido pPan5-W33 delAsc delCla fue digerido con Ascl y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-28 Ascl (7941) en Ascl (11065) (crea un gen de la polimerasa quimérico). El clon con la orientación correcta se denominó pPan5-W33 del Cla.

45 4. Inserción del fragmento Clal (18577) en Clal (30273)

El plásmido pPan5-W33 del Cla fue digerido con Clal y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-28 Clal (18577) en Clal (30273). El clon con la orientación correcta se denominó pC5/C28 IP.

50 El plásmido pC5/C28 IP porta un ADN vírico con el E1 delecionado del Ad Pan 5 (SAdV-22) en el que un segmento interno de 25603 pb (pb nº 7955 - pb nº 33557) ha sido sustituido por un segmento análogo funcional de 24779 pb (pb nº 7946 - pb nº 32657) del SAdV-28, es decir, esto da como resultado la sustitución de los genes del SAdV-22 para la proteína pre-terminal, la proteína 52/55K, la base pentona, la pVII, el Mu, la hexona, la endoproteasa, la proteína de unión al ADN, la proteína de soporte de 100 K, la proteína de 33 K, la pVIII, la región E3 y la fibra, por los del SAdV-28. El Ascl en el extremo izquierdo del fragmento del SAdV-28 está en el comienzo del marco abierto de lectura de la polimerasa de ADN (residuo 236 de la proteína de 1192 residuos) y da como resultado una proteína quimérica. El sitio EcoRI, que constituye el extremo derecho del fragmento del SAdV-28 está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la E4. El extremo derecho se ligó a un fragmento terminal derecho generado mediante una PCR del Ad Pan 5, de forma que el producto de la traducción regenerado orf 6/7 de la E4 sea quimérico entre el Ad Pan 5 y el SAdV-28.

C. Construcción de un clon molecular de plásmido basado en el SAdV-29, mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular

65 Debido a que tanto los informes publicados como la experiencia de los inventores con AdC1 han indicado que las deleciones E1 en los adenovirus del subgrupo B no son complementadas por los genes Ad5 E1 en las células HEK

293, se generó un adenovirus híbrido basándose en una estrategia mediante el uso del AdC1 [Roy et al., J Virol. Methods. (2007) 141, 14-21; Roy et al., J Gen Virol. (2006) 87, 2477-2485], en el que los extremos izquierdo y derecho de una construcción quimérica derivan del adenovirus de chimpancé Pan 5 (también conocido como el adenovirus de simio 22).

El plásmido de partida era uno que había sido construido en un intermedio de la construcción del vector quimérico AdC1 - pPan5C1delRI, según se describe en el documento WO 2005/001103 A3, publicado el 6 de enero de 2005.

1. PCR

El segmento Ad C1 del pPan5C1delRI (entre Clal y EcoRI) fue sustituido por un fragmento generado mediante una PCR mediante el uso del ADN vírico del SAdV-29 como molde. Los cebadores de la PCR contienen los sitios Clal y EcoRI, respectivamente. Se usaron los cebadores CCATCTATCGATGCATAATCAGCAAACC [SEQ ID NO: 33] y CTCAAATGGAATTCAAATGTTTAAAG [SEQ ID NO: 34]. El cebador 'W33 directo' contiene el sitio Clal (subrayado). Las dos bases que siguen al sitio Clal son CA en la secuencia natural, pero se han cambiado por GC en el cebador para convertir el sitio Clal en uno que no esté metilado en las bacterias. Este cambio altera un aminoácido - S94C - en la proteína E3 de 106 aminoácidos que es homóloga de la supuesta proteína del Ad4 CR1 delta de 11 K). El cebador 'W33 inverso' contiene el sitio EcoRI (subrayado). La correspondiente secuencia natural del Ad es GAATCC. La base cambiada está en un codón para la isoleucina (residuo 123 del orf 6/7 de la proteína E4) que no se ve alterada por este cambio.

El sitio Clal es el mismo que el que está en el 30303 del SAdV-29; se creó el sitio EcoRI en el cebador de forma que su empalme con la región E4 del Ad Pan 5 crea un orf 6/7 de la E4 quimérico (el sitio EcoRI en pPan5C1delRI está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la proteína E4 del Ad Pan 5).

Se llevó a cabo una PCR mediante el uso de la polimerasa NEB Phusion y de los tampones proporcionados por el fabricante.

El producto de 2480 pb PCR fue digerido con EcoRI y Clal y clonado en pPan5C1 delRI entre los dos mismos sitios para producir pPan5C1delR1-C29 PCR.

2. Inserción del fragmento Ascl (11094) en Clal (18583) (entre el sitio Ascl presente en el gen pol y el único sitio Clal).

El plásmido pPan5C1delR1-C29 PCR fue digerido con Ascl y Clal y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-29 Ascl (11094) en Clal (18583) (entre el sitio Ascl presente en el gen pol y el único sitio Clal), para producir el pPan5-C29 delAsc delCla.

3. Inserción del fragmento Ascl (7945) en Ascl (11094) (para crear un gen de la polimerasa quimérico).

El plásmido pPan5-C29 delAsc delCla fue digerido con Ascl y en él se clonó el fragmento de ADN vírico del SAdV-29 Ascl (7945) en Ascl (11094) (crea un gen de la polimerasa quimérico). El clon con la orientación correcta se denominó pPan5-C29 del Cla.

4. Inserción del fragmento Clal (18583) en Clal (30303).

El plásmido pPan5-C29 del Cla fue digerido con Clal y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-29 Clal (18583) en Clal (30303). El clon con la orientación correcta se denominó pC5/C29 IP. El plásmido pC5/C29 IP porta un ADN vírico (SAdV-22) con el E1 delecionado del Ad Pan 5 en el que un segmento interno de 25603 pb (pb n° 7955 - pb n° 33557) ha sido sustituido por un segmento análogo funcional de 24817 pb (pb n° 7945 - pb n° 32761) del SAdV-29, es decir, esto da como resultado la sustitución de los genes del SAdV-22 para la proteína pre-terminal, la proteína 52/55 K, la base pentona, la pVII, el Mu, la hexona, la endoproteasa, la proteína de unión al ADN, la proteína de soporte de 100 K, la proteína de 33 K, la pVIII, la región E3 y la fibra, por los del SAdV-29. El Ascl en el extremo izquierdo del fragmento del SAdV-29 está en el comienzo del marco abierto de lectura de la polimerasa de ADN (residuo 236 de la proteína de 1192 residuos) y da como resultado una proteína quimérica. El sitio EcoRI, que constituye el extremo derecho del fragmento del SAdV-29, está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la E4. El extremo derecho se ligó a un fragmento terminal derecho generado mediante una PCR del Ad Pan 5 de forma que el producto de la traducción regenerado del orf 6/7 de la E4 sea quimérico entre el Ad Pan 5 y el SAdV-29.

D. Construcción de un clon molecular de plásmido basado en el SAdV-32, mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular

Debido a que tanto los informes publicados como la experiencia de los inventores con AdC1 han indicado que las delecciones E1 en los adenovirus del subgrupo B no son complementadas por los genes Ad5 E1 en las células HEK 293, se generó un adenovirus híbrido basándose en una estrategia mediante el uso del AdC1 [Roy et al., J Virol. Methods. (2007) 141, 14-21; Roy et al., J Gen Virol. (2006) 87, 2477-2485], en el que los extremos izquierdo y

derecho de una construcción quimérica derivan del adenovirus de chimpancé Pan 5 (también conocido como el adenovirus de simio 22).

El plásmido de partida era uno que había sido construido en un intermedio de la construcción del vector quimérico AdC1 - pPan5C1delRI, según se describe en el documento WO 2005/001103 A3, publicado el 6 de enero de 2005.

1. PCR

El segmento Ad C1 del pPan5C1delRI (entre ClaI y EcoRI) fue sustituido por un fragmento generado mediante una PCR mediante el uso del ADN vírico del SAdV-32 como molde.

Se usaron los cebadores SEQ ID NO: 202: TTGTAGCATAGTTTGCCTGG [C32 directo] y SEQ ID NO: CTCAAATGGAAT- TCAAATGTTTAAAG [SEQ ID NO: 34, (W33 inverso)]. El cebador 'W33 inverso' contiene el sitio EcoRI (subrayado). La correspondiente secuencia del Ad natural es GAATCC. La base cambiada está en un codón para la isoleucina del orf 6/7 de la proteína E4, que no se ve alterada por este cambio. Se creó un sitio EcoRI en el cebador de forma que su empalme con la región E4 del Ad Pan 5 crea un orf 6/7 de la E4 quimérico (el sitio EcoRI de pPan5C1delRI está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la proteína E4 del Ad Pan 5).

Se llevó a cabo una PCR mediante el uso de la polimerasa NEB Phusion y de los tampones proporcionados por el fabricante.

El producto de 2259 pb fue digerido con MluI y EcoRI y se clonó en pPan5C1 delRI entre los dos mismos sitios para producir el pPan5C1 C32 PCR.

2. Inserción del fragmento Ascl (7945) en MluI (16058) del SAdV-32 (entre el sitio Ascl presente en el gen pol y el sitio MluI).

El plásmido pPan5C1 C32 PCR fue digerido con Ascl y MluI y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-32 viral (7945) en MluI (16058), para producir el pPan5/C32 del Mlu.

3. Inserción del fragmento MluI (desde 16058 hasta 30510).

El plásmido pPan5/C32 del Mlu fue digerido con MluI y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-32 MluI (desde 16058 hasta 30510). El clon con la orientación correcta se denominó pC5/C32 IP.

El plásmido pC5/C32 IP porta un ADN vírico con el E1 deleciónado del Ad Pan 5 (SAdV-22) en el que un segmento interno de 25603 pb (pb nº 7955 - pb nº 33557) ha sido sustituido por un segmento análogo funcional de 24817 pb (pb nº 7945 - pb nº 32761) del SAdV-32, es decir, esto da como resultado la sustitución de los genes del SAdV-22 para la proteína pre-terminal, la proteína 52/55 K, la base pentona, la pVII, el Mu, la hexona, la endoproteasa, la proteína de unión al ADN, la proteína de soporte de 100 K, la proteína de 33 K, la pVIII, la región E3 y la fibra, por los del SAdV-32. El Ascl en el extremo izquierdo del fragmento del SAdV-32 está en el comienzo del marco abierto de lectura de la polimerasa de ADN (residuo 236 de la proteína de 1192 residuos) y da como resultado una proteína quimérica. El sitio EcoRI, que constituye el extremo derecho del fragmento del SAdV-32, está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la E4. El extremo derecho se ligó a un fragmento terminal derecho generado mediante una PCR del Ad Pan 5, de forma que el producto de la traducción regenerado orf 6/7 de la E4 sea quimérico entre el Ad Pan 5 y el SAdV-32.

E. Construcción de un clon molecular de plásmido con el E1 deleciónado basado en el SAdV-35, mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular

Debido a que tanto los informes publicados como la experiencia de los inventores con AdC1 han indicado que las deleciones E1 en los adenovirus del subgrupo B no son complementadas por los genes Ad5 E1 en las células HEK 293, se generó un adenovirus híbrido basándose en una estrategia mediante el uso del AdC1 [Roy et al., J Virol. Methods. (2007) 141, 14-21; Roy et al., J Gen Virol. (2006) 87, 2477-2485], en el que los extremos izquierdo y derecho de una construcción quimérica derivan del adenovirus de chimpancé Pan 5 (también conocido como el adenovirus de simio 22).

El plásmido de partida era uno que había sido construido en un intermedio de la construcción del vector quimérico AdC1 - pPan5C1delRI, según se describe en el documento WO 2005/001103 A3, publicado el 6 de enero de 2005.

1. Inserción del fragmento Ascl (11058) en EcoRI (22198) del SAdV-35.

El plásmido pPan5C1delRI fue digerido con Ascl y EcoRI y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-35 Ascl (11058) en EcoRI (22198), para producir el pPan5C1 C35 Asc-RI.

2. Inserción del fragmento Ascl (desde 7928 hasta 11058)

El plásmido pPan5CI C35 Asc-RI fue digerido con Ascl y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-35 Ascl (desde 7928 hasta 11058). El clon con la orientación correcta se denominó pPan5CI C35 Asc-RI + Asc.

3. Inserción del fragmento EcoRI (desde 22198 hasta 32738)

El plásmido pPan5CI C35 Asc-RI + Asc fue digerido con EcoRI y en él se clonó el fragmento del ADN vírico del SAdV-35 EcoRI (desde 22198 hasta 32738). El clon con la orientación correcta se denominó pC5/C35 IP.

El plásmido pC5/C35 IP porta un ADN vírico con el E1 deleciónado del Ad Pan 5 (SAdV-22) en el que un segmento interno de 25603 pb (pb nº 7955 - pb nº 33557) ha sido sustituido por un segmento análogo funcional de 24817 pb (pb nº 7945 - pb nº 32761) del SAdV-35, es decir, esto da como resultado la sustitución de los genes del SAdV-22 para la proteína pre-terminal, la proteína 52/55 K, la base pentona, la pVII, el Mu, la hexona, la endoproteasa, la proteína de unión al ADN, la proteína de soporte de 100 K, la proteína de 33 K, la pVIII, la región E3 y la fibra, por los del SAdV-35. El Ascl en el extremo izquierdo del fragmento del SAdV-35 está en el comienzo del marco abierto de lectura de la polimerasa de ADN (residuo 236 de la proteína de 1192 residuos) y da como resultado una proteína quimérica. El sitio EcoRI, que constituye el extremo derecho del fragmento del SAdV-35, está en el marco abierto de lectura orf 6/7 de la E4. El extremo derecho se ligó a un fragmento terminal derecho generado mediante una PCR del Ad Pan 5, de forma que el producto de la traducción regenerado orf 6/7 de la E4 sea quimérico entre el Ad Pan 5 y el SAdV-35.

F. Vectores adenovíricos con el E1 deleciónado

Con objeto de construir vectores adenovíricos con el E1 deleciónado que expresan la nucleoproteína del virus de la gripe, se optimizaron los codones de la secuencia de nucleótidos de la NP del virus de la gripe A H1N1 (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai, número de registro del GenBank AF389119.1) y se sintetizó completamente (Celtek Genes, Nashville, TN). Se construyó un casete de expresión formado por el promotor temprano del citomegalovirus humano, un intrón sintético (obtenido a partir del plásmido pCI (Promega, Madison, Wisconsin), la secuencia codificante con los codones optimizados de la NP de la gripe A y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. El plásmido pShuttle CMV PI FluA NP porta el casete de expresión anteriormente descrito en el que está flanqueado por los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de corte raro I-CeuI y PI-SceI (New England Biolabs) respectivamente. Con objeto de crear un clon molecular de un vector adenovírico con el E1 deleciónado, se creó en primer lugar un clon molecular del plásmido de los adenovirus con el E1 deleciónado en el que se han insertado los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción de corte raro I-CeuI y PI-SceI en lugar de una deleción E1. Los plásmidos adenovíricos con el E1 deleciónado se digirieron después con I-CeuI y PI-SceI y se ligó en ellos el casete de expresión (digerido con las mismas enzimas). Los clones moleculares del plásmido adenovírico resultante se transfectaron en células HEK 293 para rescatar el vector adenovírico recombinante. Se encontró que el rescate posterior a la transfección estaba facilitado si en primer lugar se liberaba el genoma adenovírico lineal del plásmido mediante una digestión con enzimas de restricción.

Ejemplo 3 – Evaluación de la neutralización cruzada

Se evaluó la actividad de neutralización cruzada de los SAdV-27, SAdV-28, SAdV-29, SAdV-32 y SAdV-35 naturales en comparación con el Adenovirus 5 humano (subespecie C) y el adenovirus 7 de chimpancé (SAdV-24), y las IgG humanas se agruparon mediante el uso de un ensayo de anticuerpos neutralizantes de inhibición de la infección monitorizado mediante una inmunofluorescencia directa. Las IgG humanas agrupadas [IgG Hu agrupadas] fueron adquiridas comercialmente y aprobadas para su administración en pacientes inmunodeprimidos, ya que contienen anticuerpos contra varios antígenos a los que está expuesta la población humana en general. La presencia o la ausencia de anticuerpos neutralizantes contra los adenovirus de simio para las IgG humanas agrupadas es un reflejo de la prevalencia de los anticuerpos contra estos adenovirus en la población general.

El ensayo se llevó a cabo como sigue. Las muestras séricas de los conejos a los que se les inyectaron el HAdV-5 o el SAdV-24 fueron inactivadas con calor a 56 °C durante 35 min. Los adenovirus naturales (10^6 partículas/pocillo) se diluyeron en medio de Eagle modificado por Dulbecco exento de suero (DMEM) y se incubaron con diluciones dobles sucesivas de las muestras séricas inactivadas con calor en DMEM durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, la mezcla de suero-adenovirus se añadió a portaobjetos en pocillos con una monocapa de 10^5 células A549. Después de 1 h, las células de cada pocillo se complementaron con 100 μ l de suero bovino fetal al 20 % (FBS)-DMEM y se cultivaron durante 22 h a 37 °C en un 5 % de CO₂. Después, las células se aclararon dos veces con PBS y se tiñeron con DAPI y un anticuerpo de cabra con una amplia reactividad cruzada marcado con FITC (Virostat) creado contra el HAdV-5 después de una fijación en paraformaldehído (al 4 %, 30 min) y una permeabilización en Triton al 0,2 % (a 4 °C, 20 min). El nivel de infección se determinó mediante el recuento del número de células positivas para FTTC bajo un microscopio. El título de NAB se notificó como la mayor dilución sérica que inhibía la infección por adenovirus en un 50 % o más, en comparación con el suero de control sin tratar.

Cuando se muestra un valor del título < 1/20, la concentración de anticuerpos neutralizantes está por debajo del límite de detección, es decir, de 1/20.

| Especie | Virus | Anti-HAdV-5 | Anti-SAdV-24 | IgG H. agrupadas |
|---------|--------------|-------------|--------------|------------------|
| C | HAdV-5 | 1/81.920 | < 1/20 | 1/640 |
| E | SAdV-24 (C7) | < 1/20 | 1/655.360 | 1/20 |
| | SAdV-27 | 1/20 | < 1/20 | < 1/20 |
| B | SAdV-28 | < 1/20 | < 1/20 | 1/40 |
| | SAdV-29 | < 1/20 | < 1/20 | < 1/20 |
| | SAdV-32 | < 1/20 | < 1/20 | < 1/20 |
| | SAdV-35 | < 1/20 | < 1/20 | 1/20 |

5 Estos datos indican que no hay ninguna inmunidad preexistente detectable contra el SAdV-27, el SAdV-29 ni el SAdV-32 en la población en general; y una mínima inmunorreactividad contra el SAdV-28 y el SAdV-35. Estos datos indican adicionalmente que los adenovirus de simio de la anterior Tabla, que no presentan reactividad cruzada con el HAdV-5 ni con el SAdV-24, podrían ser útiles en regímenes que implican la administración secuencial de adenovirus, por ejemplo, en terapias de sensibilización y refuerzo u oncológicas.

10 Ejemplo 4 – Inducción de citocinas

Se aislaron células dendríticas plasmacitoides a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y se cultivaron en medio en placas de 96 pocillos y se infectaron con los adenovirus. Después de 48 h las células se rotan y el sobrenadante se recoge y se analiza para evaluar la presencia de interferón α .

Más específicamente, las PBMC se obtuvieron en el centro de inmunología del Center For SIDA Research (CFAR) de la University of Pennsylvania. Después se usaron 300 millones de estas células para aislar las células dendríticas plasmacitoides (pDC) mediante el uso del "kit de aislamiento de células dendríticas plasmacitoides humanas" de Miltenyi Biotec según las instrucciones proporcionadas junto con el kit. El aislamiento mediante el uso de este kit se basó en la eliminación de todos los demás tipos celulares excepto las pDC a partir de las PBMC.

La cantidad final de células habitualmente es variable de un donante a otro, pero varía entre 0,4-0,7 millones de células. De forma que los datos que se han generado (analizados a continuación) proceden del análisis de las células de múltiples donantes. No obstante, sorprendentemente, la separación de los subgrupos basada en la liberación de interferón o de otras citocinas se mantiene incluso cuando se analizan células procedentes de múltiples donantes.

Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Mediatech) complementado con L-glutamina, suero bovino fetal al 10 % (Mediatech), solución tampón de Hepes 10 mM (Invitrogen), antibióticos (penicilina, estreptomycin y gentamicina - de Mediatech) e interleucina humana 3 (20 ng/ml - R&D). Se añadieron directamente los adenovirus naturales a las células a una multiplicidad de infección (MOI) de 10.000 (10.000 partículas víricas por célula, con una concentración de 10^6 células/ml). Después de 48 h las células se rotaron y el sobrenadante se ensayó para evaluar la presencia de interferón. Las citocinas se midieron mediante el uso de un kit de ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA) de PBL Biomedical Laboratories mediante el uso del protocolo recomendado por el fabricante.

El estudio demostró que los adenovirus del subgrupo C no producían unas cantidades detectables de IFN α (el ensayo tiene un límite de detección de 1.250 pg/ml). Por el contrario, todos los miembros ensayados de los adenovirus del subgrupo E producían IFN α y, en general, producían significativamente más IFN α en comparación con el subgrupo de adenovirus B.

También se detectaron otras diversas citocinas en el cribado de los adenovirus. Sin embargo, en general, los adenovirus del subgrupo E producían unos niveles significativamente mayores de IL-6, de RANTES, de MIP-1 α , de TNF- α , de IL-8 y de 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 , de IL-6, de RANTES y de MIP1 α .

Dado que no se observó una lisis celular significativa en este estudio, esto sugiere que la citocina es producida mediante el contacto de las células con los adenovirus del subgrupo E, independientemente de la infección y en ausencia de cualquier cantidad significativa de replicación vírica.

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

En el ámbito de la anteriormente identificada memoria descriptiva se incluyen numerosas modificaciones y variaciones, y se espera que sean obvias para el experto en la materia. Se cree que dichas modificaciones y alteraciones, tales como las selecciones de diferentes minigenes o la selección de los vectores o de los moduladores inmunitarios, están en el ámbito de las reivindicaciones anexas a la misma.

5

REIVINDICACIONES

1. Un adenovirus que tiene una cápside que comprende:
- 5 una proteína hexona del SAdV-28, los aminoácidos 1 a 944 de la SEQ ID NO: 11;
una proteína pentona del SAdV-28, los aminoácidos 1 a 582 de la SEQ ID NO: 6; y
una proteína de fibra del SAdV-28, los aminoácidos 1 a 323 de la SEQ ID NO: 21;
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 del mismo en una célula
10 hospedadora, y que comprende adicionalmente los elementos en cis en 5' y en 3' del adenovirus necesarios para
la replicación y la encapsidación.
2. El adenovirus según la reivindicación 1, en el que dicho adenovirus recombinante carece de la totalidad o de parte
del gen E1.
- 15 3. El adenovirus según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho adenovirus tiene una replicación
defectuosa.
4. El adenovirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho adenovirus es un adenovirus
pseudotipado que comprende los elementos en cis en 5' y en 3' del adenovirus necesarios para la replicación y la
20 encapsidación, comprendiendo dichos elementos en cis una repetición terminal invertida en 5' del adenovirus y una
repetición terminal invertida en 3' del adenovirus.
5. Una composición que comprende un virus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un portador
25 farmacéuticamente aceptable.
6. Un adenovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en la administración de una
molécula a una célula objetivo.