

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 593**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2016 PCT/EP2016/057982**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16166088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2016 E 16719791 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3283634**

54 Título: **Adenovirus recombinante que expresa dos transgenes con un promotor bidireccional**

30 Prioridad:

**14.04.2015 US 201562147453 P**  
**14.04.2015 EP 15163538**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.12.2019**

73 Titular/es:

**JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.**  
**(100.0%)**  
**Archimedesweg 4**  
**2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**WUNDERLICH, KERSTIN;**  
**CUSTERS, JERÔME, H, H, V,;**  
**VELLINGA, JORT y**  
**SANDERS, BARBARA, PETRONELLA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 733 593 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 recombinante que expresa dos transgenes con un promotor bidireccional

**5 CAMPO TÉCNICO**

La invención se refiere al campo de la medicina y al campo de la administración del gen para las aplicaciones en la vacunación y terapia génica. Más en particular, la invención se refiere al adenovirus recombinante y vectores de adenovirus recombinante con promotores bidireccionales para la expresión de dos transgenes.

10

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los adenovirus humanos y animales recombinantes se utilizan ampliamente para su aplicación en la terapia génica y la vacunación. Para estas aplicaciones, los vectores de adenovirus se utilizan como portadores de un gen o genes de interés para introducirse en las células huésped. Por ejemplo, los vectores de adenovirus se pueden usar para expresar un gen o parte del mismo que codifica un antígeno deseado para provocar una respuesta inmune.

15

Los vectores de adenovirus de primera generación típicamente solo incluyen un transgén. Se publican muchas estrategias para estos vectores de primera generación. Las estrategias publicadas informan el uso de una variedad de vectores de adenovirus diferentes y muestran que el casete de expresión transgénica se puede colocar en diferentes regiones del adenovirus, por ejemplo, en la región E1, la región E3, o entre E4 y la ITR derecha.

20

Sin embargo, para propósitos de vacunas, a menudo se requiere más de un antígeno o el mismo antígeno de varias cepas diferentes para lograr protección y una amplia cobertura. Por lo tanto, en ciertos casos, es deseable expresar al menos dos antígenos de un vector adenoviral. Se han descrito diferentes enfoques para codificar dos antígenos en un vector adenoviral.

25

En un enfoque de los dos primeros antígenos, se colocó un casete de expresión de antígeno en la región E1 y el segundo se colocó en la región E3 (por ejemplo, (Vogels y col., 2007)). En un enfoque diferente de dos antígenos, un casete de expresión de antígeno se colocó en E1 y el segundo entre E4 y la ITR derecha (por ejemplo, (Holman y col., 2007; Pham y col., 2009; Schepp-Berglind y col., 2007)). En otro enfoque adicional de dos antígenos, los dos casetes de expresión de antígenos se colocaron en la región E1 en forma de cabeza a cola utilizando dos secuencias promotoras diferentes en un intento de evitar la inestabilidad genética por recombinación (por ejemplo, (Belousova y col., 2006; Harro y col., 2009)).

30

35

También se han publicado otros dos enfoques de antígenos para diferentes vectores virales, por ejemplo con vectores lentivirales. Los ejemplos incluyen el uso de promotores bidireccionales o el uso de un sitio de entrada ribosómica interno (IRES) de virus de ARN de cadena positiva (por ejemplo, derivados de EMCV) para producir un transcrito único que se traduce en dos proteínas (por ejemplo, (Amendola, Venneri, Biffi, Vigna, & Naldini, 2005; Na & Fan, 2010)). Otros ejemplos incluyen la utilización de la maquinaria de empalme de la célula huésped o el uso de péptidos de «escisión» derivados de virus de ARN de cadena positiva, tal como la secuencia 2A de la fiebre aftosa o equivalentes de otros virus para producir una poliproteína que se escinde en dos proteínas. Según los informes publicados, todas estas estrategias pueden ser igualmente útiles y exitosas.

40

Cuando dos antígenos están codificados en un vector adenoviral, se deben mantener varias características de un vector monovalente para que el vector multivalente sea tanto producible como útil para fines de vacunas. Las características importantes incluyen estabilidad genética durante el aumento de escala, productividad del vector a gran escala, expresión de alto nivel de ambos antígenos e inmunogenicidad de ambos antígenos. Sin embargo, para la mayoría de las estrategias publicadas, la estabilidad genética y otras características de los vectores no se han analizado sistemáticamente.

45

50

En la presente se describen los resultados experimentales que muestran que los enfoques descritos en la técnica anterior para expresar dos antígenos con un adenovirus recombinante único, llevan a: a) estabilidad genética reducida en el procedimiento de aumento de escala del adenovirus recombinante (como se puede imitar mediante un pasaje seriado en la línea celular auxiliar); b) productividad reducida del adenovirus recombinante (lo que disminuye la posibilidad de aumentar de escala los vectores a grandes lotes purificados); c) expresión reducida de los antígenos; y/o d) inmunogenicidad reducida de uno o más de los antígenos (en el modelo de ratón). Estas son claras desventajas que no apoyan el uso a gran escala de adenovirus recombinante para expresar dos antígenos como se describe en la técnica anterior.

55

60

Por lo tanto, queda una necesidad de proporcionar un adenovirus recombinante que sea genéticamente estable y que exprese dos antígenos de una manera donde se mantiene la inmunogenicidad de ambos antígenos.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

65

La presente invención proporciona procedimientos para obtener y usar adenovirus recombinante (rAd) y vectores de

rAd. El rAd y vectores de rAd comprenden dos transgenes, donde un primer transgén está operativamente unido a un promotor de citomegalovirus (mCMV) de ratón bidireccional en una dirección y un segundo transgén está operativamente unido al promotor de mCMV bidireccional en la otra dirección. Los rAd de la presente invención son genéticamente estables, sin que se detecten bandas de supresión por análisis de PCR hasta el pasaje 13 (p13), de este modo se proporciona una estabilidad genética que es comparable con rAd con un transgén único. Además, ambos transgenes se expresan de forma potente en función del análisis FACS de la expresión transgénica y el análisis ELISPOT y ELISA de la inmunogenicidad de los antígenos expresados con respecto a las respuestas de las células T y B. Por lo tanto, se determinó que los rAd de la presente invención con un promotor bidireccional es adecuado para uso en terapia génica y aplicaciones de vacunas.

Las realizaciones generales y preferidas se definen, respectivamente, por las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas a la misma. Otras realizaciones, características y ventajas preferidas de los diversos aspectos de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras de los dibujos adjuntos.

En una realización, la presente invención proporciona un adenovirus recombinante que comprende un promotor de CMV de ratón (mCMV) bidireccional operativamente unido a un primer transgén en una dirección y a un segundo transgén en la dirección opuesta.

En otra realización, la presente invención también proporciona un procedimiento de producir un adenovirus recombinante que comprende un primer y un segundo transgén, el procedimiento que comprende: preparar un constructo que comprende un promotor de mCMV bidireccional operativamente unido a un primer transgén en una dirección y a un segundo transgén en la dirección opuesta, e incorporar dicho constructo en el genoma del adenovirus recombinante.

En ciertas realizaciones, el adenovirus recombinante además comprende un intrón ubicado 3' del promotor y 5' del primer transgén y un intrón ubicado 3' del promotor y 5' del segundo transgén.

En ciertas realizaciones, el adenovirus recombinante tiene una supresión en la región E1, y en ciertas realizaciones comprende el promotor de mCMV bidireccional y el primer y segundo transgenes y opcionalmente los intrones, en esta región E1.

En ciertas realizaciones, el primer y segundo transgén son diferentes y al menos uno de ellos codifica un antígeno. En ciertas realizaciones ambos codifican un antígeno diferente.

En ciertas realizaciones, el adenovirus es un adenovirus humano serotipo 35 o un adenovirus humano serotipo 26.

En otra realización, la presente invención también proporciona un procedimiento *in vitro* para expresar al menos dos transgenes en una célula, el procedimiento que comprende proporcionar una célula con un vector adenoviral recombinante según la invención.

En otra realización, la presente invención también proporciona un vector adenoviral recombinante según la invención para usar en la inducción de una respuesta inmune contra al menos dos antígenos.

En otra realización, la presente invención también proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende el genoma de un adenovirus recombinante según la invención.

En otra realización, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un adenovirus recombinante según la invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es una vacuna.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**Fig. 1:** Diseño y prueba de rAd monovalente que codifica un transgén único. (A) Dibujo esquemático del diseño genético de rAd con un casete de expresión para un gen único en la región E1 y una señal de empaquetamiento  $\Psi$ . (B) Representación esquemática de las pruebas de estabilidad genética a pequeña escala con análisis de PCR para virus pasados en células de empaquetamiento PER.C6®. El pasaje p13 es 3 pasajes más allá de la escala comercial, según los detalles del procedimiento. (C) Se muestran los resultados del análisis de PCR de identidad E1 para 4 virus diferentes: rAd35.E1.EBOV, rAd35.E1.SEBOV, rAd35.E1.MARV y rAd26.E1.EBOV. Los números del 1-5 representan el ADN de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6®. P+ es el control de plásmido positivo que muestra el tamaño esperado de la banda de PCR y P- es un control de plásmido negativo que muestra el tamaño de un casete de expresión sin un antígeno. H<sub>2</sub>O es el control de agua de la PCR y M son los marcadores de peso molecular.

**Fig. 2:** Diseño y prueba de rAd E1-E3 bivalente. (A) Dibujo esquemático del diseño genético de rAd con un casete de expresión con gen 1 en la región E1 corriente debajo de ITR derecho y un segundo casete de expresión con un gen 2

en la región E3. El vector rAd35 tenía la orientación invertida en la región E3 como se muestra en (A). (B) Se muestran los resultados del análisis de PCR de las regiones del transgén E1 y E3 del pasaje 5 (p5), pasaje 10 (p10) y pasaje 15 (p15) para un vector bivalente rAd35, rAd35.E1.EBOV-E3.SEBOV. Los números del 1-5 representan el ADN de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6@. P+ es el control de plásmido positivo que muestra el tamaño esperado de la banda de PCR y P- es un control de plásmido negativo que muestra el tamaño de un casete de expresión sin un antígeno. H<sub>2</sub>O es el control de agua de la PCR y M son los marcadores de peso molecular. Los asteriscos indican bandas de PCR no específicas presentes tanto en el control positivo como en las diferentes placas analizadas. Las puntas de flecha indican bandas de supresión, que representan productos de PCR amplificados a partir de genomas virales que han suprimido total o parcialmente el antígeno o el casete de expresión.

**Fig. 3:** Diseño y prueba de rAd bivalente con un casete de expresión bicistrónico en E1. (A) Diseño esquemático de vectores bicistrónicos utilizando el enfoque F2A para los vectores bivalentes rAd que codifican el gen 1 y el gen 2 que comprenden, eGFP y luciferasa, luciferasa y eGFP, o MARV y SEBOV, respectivamente. Ambos antígenos, el gen 1 y el gen 2, están codificados en la región E1 en un ARNm y la expresión está dirigida por un hCMV. La parte F2A (furina-2A) codifica un sitio de reconocimiento de furina y un péptido 2A derivado del virus de la fiebre aftosa por picornavirus (FMDV), que lleva a la separación de los productos proteicos codificados por el gen 1 y el gen 2. La secuencia de aminoácidos de la parte F2A es como se describió anteriormente ((de Felipe, Luke, Brown y Ryan, 2010; Donnelly y col., 2001)) (B) Se muestran los resultados del análisis de PCR de la región del transgén de diferentes rAd35 bivalentes con el diseño E1-F2A en el pasaje 13 (p13). Los números del 1-5 representan el ADN de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6@. P+ es el control de plásmido positivo que muestra el tamaño esperado de la banda de PCR y H<sub>2</sub>O es el control de agua de la PCR y M son los marcadores de peso molecular. Un asterisco indica una banda de PCR no específica presente tanto en el control positivo como en las diferentes placas analizadas. Las puntas de flecha indican bandas de supresión, que representan productos de PCR amplificados a partir de genomas virales que han suprimido total o parcialmente el antígeno o el casete de expresión. (C) Se muestra una transferencia Western para comparar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV para un vector rAd35 bivalente con un casete de expresión bicistrónico en E1 y vectores monovalentes que expresan las mismas proteínas. Las células A549 se infectaron con rAd35.MARV-F2A-SEBOV, rAd35.E1.MARV o rAd35.E1.SEBOV a 1000, 2500 y 5000 VP/célula, se recolectaron 48 hpi y se analizaron los lisados para determinar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV utilizando anticuerpos primarios específicos de MARV y SEBOV. (D) Se muestran gráficos de líneas de los resultados con tinción FACS para el análisis de la expresión en superficie de las proteínas MARV y SEBOV para comparar rAd35.MARV-F2A-SEBOV bivalente con una mezcla de vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV. Las células A549 se infectaron con rAd35.MARV-F2A-SEBOV o una mezcla de rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV a 111, 333 y 1000 VP/célula. La expresión se analizó 48 hpi y se representó % de células positivas vs VP/célula. (E) Se muestra una transferencia Western para comparar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV para un vector rAd35 bivalente con un casete de expresión bicistrónico en E1 y vectores monovalentes que expresan las mismas proteínas. Las células A549 se infectaron con rAd35.MARV-F2A-SEBOV, rAd35.E1.MARV o rAd35.E1.SEBOV a 1000, 2500 y 5000 VP/célula, se recolectaron 48 hpi y se analizaron los lisados para determinar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV utilizando Anticuerpos primarios específicos de MARV y SEBOV. (D) Se muestran gráficos de líneas de los resultados con tinción con FACS para el análisis de la expresión superficial de las proteínas MARV y SEBOV para comparar rAd35.MARV-F2A-SEBOV bivalentes con una mezcla de vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1. SEBOV. Las células A549 se infectaron con rAd35.MARV-F2A-SEBOV o una mezcla de rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV a 111, 333 y 1000 VP/célula. Se analizó la expresión 48 hpi y se graficó el % de células positivas versus VP/célula. (E) Se muestran los resultados de un ensayo ELISPOT para evaluar la inmunogenicidad en ratones en la semana 8 posterior a la inmunización con rAd35.MARV-F2A-SEBOV bivalente o una mezcla de vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV. rAd35.vacío es el control negativo. Los datos de ELISPOT se grafican como unidades formadoras de puntos (SFU)/10<sup>6</sup> esplenocitos y corresponden a las respuestas de células T específicas de SEBOV y MARV con los diferentes vectores. (F) Se muestran los resultados de un ensayo ELISA para medir las respuestas de anticuerpos (respuesta humoral, respuesta de células B) contra las glicoproteínas MARV y SEBOV, expresadas con rAd35.MARV-F2A-SEBOV bivalente o una mezcla de vectores monovalentes, rAd35. E1.MARV y rAd35.E1.SEBOV (MARV + SEBOV). rAd35.vacío es el control negativo. Los datos de ELISA se presentan en escala logarítmica como Unidades de ELISA (EU)/ml. Para los ensayos ELISPOT y ELISA (E y F), se inmunizaron grupos de diez ratones BALB/c por vía intramuscular (IM) con 1x10<sup>9</sup>VP de rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV o con 1x10<sup>9</sup> VP rAd35.E1.MARV y 1x10<sup>9</sup> VP rAd35.E1.SEBOV. Para tener en cuenta el posible efecto adyuvante del grupo que recibió el total de 2x10<sup>9</sup> VP de combinación de inserto único, el vector 1x10<sup>9</sup> VP Ad35.vacío se coinyectó con rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV. Como control negativo, dos grupos de cinco ratones recibieron un total de 2x10<sup>9</sup> VP Ad35.empty. Antes de la vacunación, los ratones también se sangraron para generar suero de control sin tratamiento previo (datos no mostrados).

**Fig. 4:** Diseño y prueba de vectores bivalentes rAd35 con un diseño E1-E1. (A) Diseño esquemático de vectores bivalentes utilizando el enfoque E1-E1: la región E1 contiene dos casetes de expresión completos en una configuración de cabeza a cola, donde la expresión del gen 1 es dirigida por el promotor del CMV humano y la expresión del gen 2 es dirigida por un promotor mCAG que se eligió debido a su secuencia heteróloga y potencia comparable al promotor CMV humano. Los dos casetes de expresión con gen 1 y gen 2 albergan señales de poliadenilación heterólogas pA1 y pA2, respectivamente. (B) Se muestran los resultados del análisis de PCR de la región del transgén de rAd35.E1.mCAG.Luc-hCMV.eGFP y rAd35.E1.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV. Los números del 1-5 representan el ADN de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6@. P+ es el control de plásmido

positivo que muestra el tamaño esperado de la banda de PCR y P- es un control de plásmido negativo que muestra el tamaño de un casete de expresión sin un antígeno. H<sub>2</sub>O es el control de agua de la PCR y M son los marcadores de peso molecular. Un asterisco indica una banda de fondo de PCR y una punta de flecha indica una banda de supresión. (C) Se muestra una transferencia Western para comparar la expresión de rAd35.E1.mCAG-MARV.hCMV-SEBOV bivalentes y vectores monovalentes rAd35.E1.MARV o rAd35.E1.SEBOV. Las células A549 se infectaron con rAd35.E1.mCAG-MARV.hCMV-SEBOV, rAd35.E1.MARV, o rAd35.E1.SEBOV a 1000, 2500 y 5000 VP/célula, se recolectaron 48 hpi, y se analizaron los lisados para determinar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV usando anticuerpos primarios específicos de MARV y SEBOV. (D) Se muestran gráficos de líneas de los resultados con tinción FACS para el análisis de la expresión en superficie de las proteínas para comparar la expresión de rAd35.E1.mCAG-MARV.hCMV-SEBOV bivalentes y una mezcla de vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV. Las células A549 se infectaron con rAd35.MARV-F2A-SEBOV o una mezcla de rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV a 111, 333 y 1000 VP/célula. Se analizó la presencia de MARV y SEBOV en la superficie de las células infectadas 48 hpi y se graficó el % de células positivas versus VP/célula. (E) Se muestran los resultados de un ensayo ELISPOT para evaluar la inmunogenicidad en ratones en la semana 8 posterior a la inmunización con rAd35.E1.mCAG-MARV.hCMV-SEBOV bivalentes o una mezcla de vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV. Ad35.vacío es el control negativo. Los datos de ELISPOT se grafican como unidades formadoras de puntos (SFU)/10<sup>6</sup> esplenocitos y corresponden a las respuestas de células T específicas de SEBOV y MARV con los diferentes vectores. (F) Se muestran los resultados de un ensayo ELISA para medir las respuestas de anticuerpos (respuesta humoral) contra las glicoproteínas MARV y SEBOV, expresadas con Ad35.E1.mCAG-MARV.hCMV-SEBOV bivalentes o una mezcla de vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV. Ad35.vacío vector es el control negativo. Los datos de ELISA se presentan en escala logarítmica como Unidades de ELISA (EU)/ml. Para los ensayos ELISPOT y ELISA (E y F), se inmunizaron grupos de diez ratones BALB/c por vía intramuscular (IM) con 1x10<sup>9</sup> VP de rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV o con 1x10<sup>9</sup> VP rAd35.E1.MARV y 1x10<sup>9</sup> VP rAd35.E1.SEBOV. Para tener en cuenta el posible efecto adyuvante del grupo que recibió el total de 2x10<sup>9</sup> VP de la combinación de inserto único, el vector 1x10<sup>9</sup> VP Ad35.vacío se coinyectó con el rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV. Como control negativo, dos grupos de cinco ratones recibieron un total de 2x10<sup>9</sup> VP Ad35.empty. Antes de la vacunación, los ratones también se sangraron para generar suero de control sin tratamiento previo (datos no mostrados).

Fig. 5: Diseño y prueba de vectores bivalentes E1 rAd35 que expresan eGFP y Firefly Luciferasa (Luc) con tres promotores bidireccionales diferentes, P<sub>bidir1</sub>, P<sub>bidir2</sub>, y P<sub>bidir3</sub>. (A) Diseño esquemático del casete de expresión bidireccional en E1: la región E1 contiene un casete de expresión dirigido por uno de los promotores bidireccionales, P<sub>bidir1</sub>, P<sub>bidir2</sub>, o P<sub>bidir3</sub>. En el casete de expresión, el gen 1 se coloca en el lado 5' en la orientación invertida y el gen 2 en el lado 3' en la orientación delantera. (B) Se muestran gráficos de barras de los niveles de expresión de Luciferasa y eGFP en células HEK293 que se transfectaron en forma transitoria con vectores E1 rAdApt35 con las tres variantes de promotores bidireccionales diferentes que incluyen a Luc y eGFP intercambiados en las posiciones del gen 1 y del gen 2. También se incluyen como controles los niveles de expresión de luciferasa y eGFP de vectores monovalentes cuando se usan individualmente (pAdApt35.eGFP o AdApt35.Luc) o en combinación (pAdApt35.eGFP + AdApt35.Luc). El nivel de expresión de eGFP se muestra como intensidad fluorescente media (MFI) y el nivel de expresión de luciferasa se muestra como unidades de luz relativas (RLU). (C) Se muestran gráficos de barras de los niveles de expresión de luciferasa o eGFP en células A549 infectadas con vectores E1 rAd35 con el promotor bidireccional P<sub>bidir3</sub> seleccionado con Luc y eGFP y se intercambian en las posiciones de gen 1 y gen 2. También se incluyen como controles los niveles de expresión de Luciferasa y eGFP de un vector rAd35 vacío sin transgén (rAd35.vacío) y vectores monovalentes utilizados individualmente (rAd35.eGFP o rAd35.Luc). Las células A549 se infectaron con 1000 VP/célula y la expresión se determinó a 48 hpi. El nivel de expresión de eGFP se muestra como intensidad fluorescente media (MFI) y el nivel de expresión de luciferasa se muestra como unidades de luz relativas (RLU). (D) Una representación esquemática del promotor bidireccional P<sub>bidir3</sub> con mCMV IE1/IE2 flanqueado por dos intrones, Intrón 2 en el lado 5' e Intrón 1 en el lado 3'.

Fig. 6: Secuencia de la secuencia del promotor bidireccional mCMV IE1/IE2 con anotaciones para diferentes segmentos funcionales. La dirección y los segmentos funcionales específicos se indican con flechas apiladas en la secuencia: la secuencia del promotor derivado de IE1/IE2 de mCMV, los potenciadores MIE2 y MIE1 en ambas direcciones, la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción (TSS) flanqueados por una secuencia de intrones derivada de ApoE1 humana y una secuencia de intrones químicos.

Fig. 7: Diseño y prueba de un vector rAd35 bivalente con un diseño bidireccional E1. (A) Diseño esquemático de los vectores bivalentes bidireccionales rAd35 E1: la región E1 contiene un casete de expresión bidireccional, donde ambos antígenos se expresan bajo el control de un promotor de CMV de ratón bidireccional utilizando señales de poliadenilación heterólogas pA1 y pA2. (B) Se muestran los resultados para el análisis de PCR de la región transgénica de tres vectores bidireccionales diferentes rAd35.E1. (rAd35.E1.eGFP-mCMV-Luc, (rAd35.E1.Luc-mCMV-eGFP, y rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV. Los números del 1-5 representan el ADN de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6®. P+ es el control de plásmido positivo que muestra el tamaño esperado de la banda de PCR y P- es un control de plásmido negativo que muestra el tamaño de un casete de expresión sin un antígeno. H<sub>2</sub>O es el control de agua de la PCR y M son los marcadores de peso molecular. No se detectaron bandas de supresión en el ADN viral de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6® para los vectores bivalentes E1-bidireccionales rAd35. (C) Se muestra una transferencia Western para comparar la expresión de MARV y SEBOV con rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalentes y vectores monovalentes

rAd35.E1.SEBOV y rAd35.E1.MARV. Las células A549 se infectaron con los vectores indicados en 1000, 2500 y 5000 VP/célula, se recolectaron 48 hpi, y se analizaron los lisados para determinar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV usando anticuerpos primarios específicos de MARV y SEBOV. (D) Se muestran gráficos de líneas de los resultados con tinción FACS para el análisis de la expresión en superficie de las proteínas para comparar la expresión de rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente y una mezcla de vectores monovalentes rAd35.E1.MARV y rAd35.E1.SEBOV. Las células A549 se infectaron con los vectores indicados en 111, 333 y 1000 VP/célula. La presencia de MARV y SEBOV en la superficie de las células infectadas se analizó 48 hpi mediante tinción con FACS y se mostró el % de células positivas. (E) Se muestran los resultados de un ensayo ELISPOT para evaluar la inmunogenicidad en ratones en la semana 8 posterior a la inmunización con rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente o una mezcla de dos vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV y rAd35.E1.SEBOV. Ad35.vacío es el control negativo. Los datos de ELISPOT se grafican como unidades formadoras de puntos (SFU)/10<sup>6</sup> esplenocitos y corresponden a las respuestas de células T específicas de SEBOV y MARV con los diferentes vectores. (F) Se muestran los resultados de un ensayo ELISA para medir las respuestas de anticuerpos (respuesta humoral) contra las glicoproteínas MARV y SEBOV en la semana 8 después de la inmunización en ratones con rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente o una mezcla de dos vectores monovalentes, rAd35.E1.MARV y rAd35.E1.SEBOV. Ad35.vacío es el control negativo. Los datos de ELISA se presentan en escala logarítmica como Unidades de ELISA (EU)/ml. Para los ensayos ELISPOT y ELISA (E y F), se inmunizaron grupos de diez ratones BALB/c por vía intramuscular (IM) con 1x10<sup>9</sup> VP de rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV o con 1x10<sup>9</sup> VP rAd35.E1.MARV y 1x10<sup>9</sup> VP rAd35.E1.SEBOV. Para tener en cuenta el posible efecto adyuvante del grupo que recibió el total de 2x10<sup>9</sup> VP de la combinación del inserto único, 1x10<sup>9</sup> VP Ad35.vacío vector se coinyectó con el rAd35.E1.MARV-mCMV-SEBOV. Como control negativo, dos grupos de cinco ratones recibieron un total de 2x10<sup>9</sup> VP Ad35.vacío. Antes de la vacunación, los ratones también se sangraron para generar suero de control sin tratamiento previo (datos no mostrados).

**Fig. 8:** Diseño y prueba de un vector rAd26 bivalente Con un diseño E1- bidireccional. (A) Diseño esquemático de los vectores rAd26 bivalentes usando el enfoque E1-bidireccional. (B) Se muestran los resultados del análisis de PCR de la región del transgén de rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente. Los números del 1-5 representan el ADN de cinco placas diferentes (poblaciones virales) pasadas a p13 en células PER.C6@. P+ es el control de plásmido positivo que muestra el tamaño esperado de la banda de PCR y P- es un control de plásmido negativo que muestra el tamaño de un casete de expresión sin un antígeno. H<sub>2</sub>O es el control de agua de la PCR y M son los marcadores de peso molecular. (C) Se muestra una transferencia Western para comparar la expresión de MARV y SEBOV de rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente y vectores monovalentes rAd26.E1.SEBOV y rAd26.E1.MARV. Las células A549 se infectaron con los vectores indicados a 10 000, 25 000 y 50 000 VP/célula, se recolectaron 48 hpi, y se analizaron los lisados para determinar la expresión de las proteínas MARV y SEBOV usando anticuerpos primarios específicos de MARV y SEBOV. (D) Se muestran gráficos de líneas de los resultados con tinción FACS para el análisis de la expresión en superficie de las proteínas para comparar la expresión de rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente y una mezcla de vectores monovalentes rAd26.E1.MARV y rAd35.E1.SEBOV. Las células A549 se infectaron con los vectores indicados en 100 000, 20 000, 4000 y 800 VP/célula. La presencia de MARV y SEBOV en la superficie de las células infectadas se analizó 48 hpi mediante tinción con FACS. Se mostró el % de células positivas. (E) Se muestran los resultados de un ensayo ELISPOT para evaluar la inmunogenicidad en ratones en la semana 8 posterior a la inmunización con rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente o una mezcla de dos vectores monovalentes, rAd26.E1.MARV y rAd26.E1.SEBOV. rAd26.vacío es el control negativo. Los datos de ELISPOT se grafican como unidades formadoras de puntos (SFU)/10<sup>6</sup> esplenocitos y corresponden a las respuestas de células T específicas de SEBOV y MARV con los diferentes vectores. (F) Se muestran los resultados de un ensayo ELISA para medir las respuestas de anticuerpos (respuesta humoral) contra las glicoproteínas MARV y SEBOV en la semana 8 después de la inmunización en ratones con rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV bivalente o una mezcla de dos vectores monovalentes, rAd26.E1.MARV y rAd26.E1.SEBOV. El rAd26.vacío es el control negativo. Los datos de ELISA se presentan en escala logarítmica como Unidades de ELISA (EU)/ml. Para los ensayos ELISPOT y ELISA (E y F), los grupos de doce ratones BALB/c se inmunizaron por vía intramuscular (IM) con 1x10<sup>9</sup> VP de rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV o con 1x10<sup>9</sup> VP de rAd26.E1.MARV y 1x10<sup>9</sup> VP de rAd26.E1.SEBOV. Para tener en cuenta el posible efecto adyuvante del grupo que recibió el total de 2x10<sup>9</sup> VP de la combinación del inserto único, 1x10<sup>9</sup> VP del vector rAd26.vacío se coinyectó con el rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV. Como control negativo, dos grupos de cuatro ratones recibieron un total de 2x10<sup>9</sup> VP rAd26.vacío. Antes de la vacunación, los ratones se sangraron para generar suero de control sin tratamiento previo (datos no mostrados).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se describen resultados experimentales que muestran que los enfoques descritos en la técnica anterior para expresar dos transgenes de un adenovirus recombinante (rAd) llevan a la inestabilidad genética de la expresión de rAd y/o del transgén reducido en comparación con rAd con transgenes únicos que expresan los mismos antígenos. Después de probar varias estrategias nuevas diferentes para resolver estos problemas, se identificó una solución novedosa usando vectores rAd con dos transgenes colocados bajo el control de un promotor de citomegalovirus (mCMV) de ratón bidireccional. El rAd de la presente invención es superior al rAd bivalente que se ha descrito en la técnica anterior. El rAd bivalente con un mCMV bidireccional es genéticamente estable, sin bandas de supresión detectadas por el análisis de PCR hasta el pasaje 13 (p13), de ese modo proporciona una estabilidad genética que es comparable a la rAd con un transgén único. Además, ambos transgenes se expresan de forma potente sobre la base de la transferencia Western y el análisis FACS de la expresión transgénica y el análisis ELISPOT y ELISA de la

inmunogenicidad de los antígenos expresados con respecto a las respuestas de las células T y B. Por lo tanto, se determinó que el rAd de la presente invención con un promotor bidireccional es adecuado para uso en terapia génica y aplicaciones de vacunas.

5 La presente invención se refiere, por lo tanto, al rAd y vectores de rAd, procedimientos para obtener y usar rAd y los vectores rAd, donde rAd y los vectores rAd comprenden un promotor de mCMV bidireccional y dos transgenes, donde un primer transgén está operativamente unido al promotor de mCMV bidireccional en una dirección y un segundo transgén está operativamente unido al promotor mCMV bidireccional en la otra dirección.

10 El rAd de la presente invención se puede producir en grandes cantidades, o lotes. Un «lote» de rAd es una composición que se ha producido en una corrida de producción en un recipiente de producción único, o alternativamente se puede referir a la pluralidad de partículas rAd en una composición que está presente en un recipiente único (por ejemplo, biorreactor, bolsa, matraz, botella, vial multidosis, vial de dosis única, jeringa, etc.). Un lote de rAd según la invención o una composición que comprende rAd según la invención comprende con preferencia al menos  $10^7$  partículas de rAd, y en ciertas realizaciones comprende al menos  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$ ,  $10^{15}$ ,  $10^{16}$ ,  $10^{17}$ ,  $10^{18}$ , o más partículas rAd, hasta  $10^{20}$  partículas rAd (por ejemplo, producidas en un biorreactor a gran escala en una ejecución de producción única). Un lote o composición puede o no comprender otros componentes relevantes además del rAd.

20 El término «recombinante» para un adenovirus recombinante, como se usa en la presente, implica que se ha modificado por la mano del hombre en oposición a los adenovirus de tipo salvaje, por ejemplo, comprende un gen, genes heterólogos, o partes de los mismos y un promotor de mCMV bidireccional.

Las secuencias de la presente se proporcionan en la dirección 5' a 3', como es habitual en la técnica.

25 Una «proteína de la cápside del adenovirus» se refiere a una proteína en la cápside de un adenovirus que implica en la determinación del serotipo y/o el tropismo de un adenovirus particular. Las proteínas de la cápside adenoviral típicamente incluyen las proteínas de fibra, pentona y/o hexona. Un rAd de (o «basado en») un cierto serotipo según la invención comprende típicamente proteínas de fibra, pentona y/o hexona de ese cierto serotipo, y con preferencia comprende proteína de fibra, penton y hexon de ese cierto serotipo. Estas proteínas están típicamente codificadas por el genoma del rAd. Un rAd de un cierto serotipo puede comprender y/o codificar opcionalmente otras proteínas de otros serotipos de adenovirus.

35 Un rAd está «basado en» un adenovirus como se usa en la presente, por derivación del tipo salvaje, al menos en secuencia. Esto se puede lograr mediante clonación molecular, usando el genoma de tipo salvaje o partes del mismo como material de partida. También es posible utilizar la secuencia conocida de un genoma de adenovirus de tipo salvaje para generar (partes del) genoma de novo por síntesis de ADN, que se puede realizar mediante procedimientos de rutina por parte de compañías de servicios que tienen negocios en el campo de la síntesis de ADN y/o clonación molecular (por ejemplo, GeneArt, GenScripts, Invitrogen, Eurofins). Por lo tanto, como ejemplo no limitante, un rAd que comprende hexona, pentona y fibra de Ad35 se considera un rAd basado en Ad35, etc.

40 Los vectores de la presente invención se denominan como vectores rAd. La preparación de vectores rAd es bien conocida en la técnica.

45 En ciertas realizaciones, un vector rAd según la invención es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1, por ejemplo, la región E1a y/o la región E1b, del genoma adenoviral que se requiere para la replicación viral. En ciertas realizaciones, un vector adenoviral según la invención es deficiente en al menos parte de la región E3 no esencial. En ciertas realizaciones, el vector es deficiente en al menos una función génica esencial de la región E1 y al menos parte de la región E3 no esencial. El vector adenoviral puede ser «deficiente en múltiples formas», lo que significa que el vector adenoviral es deficiente en una o más funciones genéticas esenciales en cada una de dos o más regiones del genoma adenoviral. Por ejemplo, los vectores adenovirales deficientes en E1 o E1-, deficientes en E3 pueden ser más deficientes en al menos un gen esencial de la región E4 y/o al menos un gen esencial de la región E2 (por ejemplo, la región E2A y/o región E2B).

55 Los vectores adenovirales, procedimientos para su construcción y los procedimientos para su propagación, son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. N.º 5.559.099, 5.837.511, 5.846.782, 5.851.806, 5.994.106, 5.994.128, 5.965.541, 5.981.225, 6.040.174, 6.020.191, 6.113.913 y 8.932.607, y Thomas Shenk, «Adenoviridae and their Replication» M. S. Horowitz, «Adenoviruses», Capítulos 67 y 68, respectivamente, en Virology, B. N. Fields y col, eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., Nueva York (1996), y otras referencias mencionadas en la presente. Normalmente, la construcción de vectores adenovirales implica el uso de técnicas biológicas moleculares estándares, tales como las descritas en, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson y col., Recombinant ADN, 2d ed., Scientific American Books (1992), y Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), y otras referencias aquí mencionadas.

65 Un adenovirus según la invención pertenece a la familia de los *Adenoviridae* y con preferencia es uno que pertenece al género *Mastadenovirus*. Puede ser un adenovirus humano, pero también un adenovirus que infecta a otras especies,

que incluyen pero sin limitación un adenovirus bovino (por ejemplo, adenovirus 3 bovino, BAdV3), un adenovirus canino (por ejemplo, CAdV2), un adenovirus porcino (por ejemplo, PAdV3 o 5) o un adenovirus simio (que incluye un adenovirus de mono y un adenovirus de simio, tal como un adenovirus de chimpancé o un adenovirus de gorila). Con preferencia, el adenovirus es un adenovirus humano (HAdV o AdHu; en la presente invención se entiende un adenovirus humano si se refiere a Ad sin indicación de especie, por ejemplo, la breve notación «Ad5» significa lo mismo que HAdV5, que es el adenovirus humano serotipo 5), o un adenovirus simio tal como adenovirus de chimpancé o gorila (ChAd, AdCh o SAdV).

La mayoría de los estudios avanzados se han realizado usando adenovirus humanos, y los adenovirus humanos se prefieren según ciertos aspectos de la invención. En ciertas realizaciones preferidas, el adenovirus recombinante según la invención se basa en un adenovirus humano. En realizaciones preferidas, el adenovirus recombinante se basa en un adenovirus humano serotipo 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49 o 50. Según una realización particularmente preferida de la invención, un adenovirus es un adenovirus humano de uno de los serotipos 26, 35. Una ventaja de estos serotipos es una baja seroprevalencia y/o títulos bajos de anticuerpos neutralizantes preexistentes en la población humana. La preparación de vectores rAd26 se describe, por ejemplo, en WO 2007/104792 y en (Abbink y col., 2007). Los ejemplos de secuencias de genoma de Ad26 se encuentran en GenBank Acceso EF 153474 y en la SEQ ID NO:1 de WO 2007/104792. La preparación de los vectores rAd35 se describe, por ejemplo, en la Patente US N.º 7.270.811, en WO 00/70071, y en (Vogels y col., 2003). Los ejemplos de las secuencias genómicas de Ad35 se encuentran en GenBank Acceso AC\_000019 y en la Fig. 6 de WO 00/70071.

Los adenovirus de simio generalmente también tienen una baja seroprevalencia y/o títulos de anticuerpos neutralizantes preexistentes en la población humana, y se ha presentado una cantidad significativa de trabajo usando vectores de adenovirus de chimpancé (por ejemplo, US6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; (Bangari & Mittal, 2006; Cohen y col., 2002; Farina y col., 2001; Kobinger y col., 2006; Lasaro & Ertl, 2009; Tasis y col., 2007). Por lo tanto, en otras realizaciones preferidas, el adenovirus recombinante se basa en un adenovirus simio, por ejemplo, un adenovirus de chimpancé. En ciertas realizaciones, el adenovirus recombinante se basa en un adenovirus simio tipo 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 o SA7P.

Las secuencias de la mayoría de los adenovirus humanos y no humanos mencionados anteriormente son conocidas, y para otras se pueden obtener mediante procedimientos de rutina.

Un adenovirus recombinante según la invención puede ser competente para la replicación o deficiente en la replicación.

En ciertas realizaciones, el adenovirus es deficiente en la replicación, por ejemplo, porque contiene una supresión en la región E1 del genoma. Una «supresión en la región E1» significa una supresión en esta región en comparación con un adenovirus de tipo salvaje, y significa una supresión en al menos una de las regiones codificadoras E1A, E1B 55K o E1B 21K, con preferencia una supresión de las regiones codificadoras E1A, E1B 55K y E1B21K. Como es conocido por los expertos, en el caso de supresiones de regiones esenciales del genoma de adenovirus, las funciones codificadas por estas regiones se deben proporcionar en trans, con preferencia por la célula productora, es decir, cuando partes o la totalidad de las regiones E1, E2 y/o E4 se suprimen del adenovirus, estas deben estar presentes en la célula productora, por ejemplo, integradas en su genoma, o en la forma del llamado adenovirus auxiliar o plásmidos auxiliares. El adenovirus también puede tener una supresión en la región E3, que es prescindible para la replicación, y, por lo tanto, tal supresión no se debe complementar.

Una célula productora (a veces también mencionada en la técnica y en la presente como «célula de empaquetamiento» o «célula complementaria» o «célula huésped») que se puede usar puede ser cualquier célula productora donde se pueda propagar un adenovirus deseado. Por ejemplo, la propagación de vectores de adenovirus recombinantes se realiza en células productoras que complementan las deficiencias en el adenovirus. Tales células productoras con preferencia tienen en su genoma al menos una secuencia E1 de adenovirus, y por lo tanto son capaces de complementar adenovirus recombinantes con una supresión en la región E1. Se puede usar cualquier célula productora complementaria de E1, tales como las células de retina humana inmortalizadas por E1, por ejemplo, células 911 o PER.C6 (véase patente US 5.994.128), amniocitos transformados con E1 (véase patente de EP 1230354), células A549 transformadas con E1 (ver, por ejemplo, WO 98/39411, patente US 5.891.690), GH329: HeLa (Gao, Engdahl, & Wilson, 2000), 293, y similares. En ciertas realizaciones, las células productoras son, por ejemplo, células HEK293, o células PER.C6, o células 911, o células IT293SF, y similares.

Para los adenovirus deficientes en E1 que no se derivan de los subgrupos C o E, se prefiere intercambiar la secuencia codificadora E4-orf6 del adenovirus no subgrupo C o E con el E4-orf6 de un adenovirus del subgrupo C tal como Ad5. Esto permite la propagación de tales adenovirus en líneas celulares complementarias bien conocidas que expresan los genes E1 de Ad5, tal como por ejemplo las células 293 o células PER.C6 (ver, por ejemplo, (Havenga y col., 2006); WO 03/104467).

En realizaciones alternativas, no es necesario colocar una región E4orf6 heteróloga (por ejemplo, Ad5) en el vector adenoviral, sino que el vector no subgrupo C o E deficiente en E1 se propaga en una línea celular que expresa tanto

E1 como un vector compatible E4orf6, por ejemplo la línea celular 293-ORF6 que expresa tanto E1 como E4orf6 de Ad5 (ver, por ejemplo, (Brough, Lizonova, Hsu, Kulesa, y Kovsed, 1996) que describe la generación de las células 293-ORF6; (Abrahamsen y col., 1997; Nan y col., 2003), cada uno de los cuales describe la generación de vectores adenovirales no del subgrupo C con supresión de E1 que utilizan dicha línea celular).

5 Alternativamente, se puede usar una célula complementaria que expresa E1 a partir del serotipo que se va a propagar (ver, por ejemplo, WO 00/70071, WO 02/40665).

10 Para los adenovirus del subgrupo B, tales como Ad35, que tienen una supresión en la región E1, se prefiere retener el extremo 3' del marco de lectura abierto E1B 55K en el adenovirus, por ejemplo, los 166 pb directamente corriente arriba del marco de lectura abierto pIX o un fragmento que comprende esto, tal como un fragmento de 243 pb directamente corriente arriba del codón de inicio pIX (marcado en el extremo 5' por un sitio de restricción *Bsu36I* en el genoma de Ad35), ya que esto aumenta la estabilidad del adenovirus debido a que el promotor del gen de pIX reside parcialmente en esta área (ver, por ejemplo, (Havenga y col., 2006); WO 2004/001032).

15 El «ácido nucleico heterólogo» (también denominado en la presente como «transgén») en los adenovirus de la invención es un ácido nucleico que no está presente de forma natural en el adenovirus. Se introduce en el adenovirus, por ejemplo, mediante técnicas estándares de biología molecular. Puede en ciertas realizaciones codificar una proteína de interés o parte de la misma. Por ejemplo, se puede clonar en una región E1 o E3 suprimida de un vector adenoviral. 20 En realizaciones preferidas de la invención, el casete de expresión con los dos transgenes bajo el control del promotor mCMV bidireccional se coloca en la región E1 del genoma adenoviral. Un transgén generalmente está operativamente unido a secuencias de control de expresión. Esto se puede hacer, por ejemplo, mediante la colocación del ácido nucleico que codifica el transgén bajo el control de un promotor. Muchos promotores se pueden usar para la expresión de un transgén, y son conocidos por los expertos.

25 Como se usa en la presente, los términos «promotor» o «región promotora» o «elemento promotor» se usan de manera intercambiable, y se refieren a un segmento de una secuencia de ácido nucleico, típicamente pero no limitado a ADN, que controla la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que está operativamente unida. La región promotora incluye secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento, unión e inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Además, la región promotora puede incluir opcionalmente secuencias que modulan este reconocimiento, 30 la unión y la actividad de iniciación de la transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias pueden ser de acción cis o pueden responder a factores de acción trans. Los promotores, según la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o regulados. La presente invención utiliza el promotor de CMV de ratón bidireccional (mCMV) para dirigir la transcripción de dos transgenes diferentes de manera bidireccional.

35 También se pueden añadir secuencias reguladoras adicionales. El término «secuencia reguladora» se usa indistintamente con «elemento regulador» en la presente y se refiere a un segmento de ácido nucleico, típicamente pero no limitado a ADN, que modula la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que está operativamente unida, y por lo tanto actúa como un modulador transcripcional. Una secuencia reguladora a menudo comprende 40 secuencias de ácido nucleico que son dominios de unión de transcripción que son reconocidos por los dominios de unión a ácido nucleico de las proteínas transcripcionales y/o factores de transcripción, potenciadores o represores, etc. Por ejemplo, una secuencia reguladora podría incluir una o más secuencias operadoras operón tetraciclina (tetO), de modo que la expresión se inhibe en presencia de la proteína represora del operón de tetraciclina (tetR). En ausencia de tetraciclina, la proteína tetR es capaz de unirse a los sitios tetO y reprimir la transcripción de un gen operativamente unido a los sitios tetO. Sin embargo, en presencia de tetraciclina, un cambio conformacional en la proteína tetR evita que se una a las secuencias del operador, lo que permite que se produzca la transcripción de genes operativamente unidos. En ciertas realizaciones, la rAd de la presente invención puede incluir opcionalmente un tetO unido operativamente a un promotor de CMV de ratón bidireccional, de manera que la expresión de uno o más transgenes se inhibe en rAd que se produce en la línea celular productora donde se expresa la proteína tetR. Posteriormente, la 50 expresión no se puede inhibir si rAd se introduce en un sujeto o en células que no expresan la proteína tetR (ver, por ejemplo, solicitud de patente internacional WO 07/073513). En ciertas otras realizaciones, rAd de la presente invención puede incluir opcionalmente un sistema de cambio de genes cumate, donde la regulación de la expresión está mediada por la unión del represor (CymR) al sitio del operador (CuO), colocado corriente abajo del promotor (véase, por ejemplo, (Mullick y col., 2006)).

55 Como se usa en la presente, el término «represor» se refiere a entidades (por ejemplo, proteínas u otras moléculas) que tienen la capacidad de inhibir, interferir, retardar y/o reprimir la producción de un producto proteico heterólogo de un vector de expresión recombinante. Por ejemplo, mediante la interferencia con un sitio de unión en una ubicación apropiada a lo largo del vector de expresión, tal como en un casete de expresión. Los ejemplos de represores incluyen 60 tetR, CymR, el represor lac, el represor trp, el represor gal, el represor lambda, y otros represores apropiados conocidos en la técnica.

65 Los adenovirus recombinantes de la presente invención comprenden un promotor de CMV de ratón (mCMV) bidireccional operativamente unido a un primer transgén en una dirección y a un segundo transgén en la dirección opuesta. El promotor de mCMV bidireccional se ha descrito en detalle en la Patente Europea. N.º EP1601776, y comprende el promotor inmediato temprano 1 mCMV (IE1) en una dirección y el el promotor inmediato temprano 2

mCMV (IE2) en dirección opuesta. Puede comprender además potenciadores, tales como los potenciadores naturales u otros. El potenciador natural para el promotor de mCMV bidireccional comprende un potenciador inmediato 1 mayor (MIE1) y un potenciador de MIE2. Los potenciadores también pueden intercambiarse por otros que no están presentes de forma natural en la región IE del mCMV y/o se colocan en otras posiciones. Con preferencia, las secuencias potenciadoras para el promotor en la primera dirección y el promotor en la otra dirección no se superponen. El promotor está en una arquitectura bidireccional, lo que significa que ambos promotores (es decir, los promotores IE1 y IE2, que juntos constituyen el promotor bidireccional IE mCMV) dirigen la expresión en orientación opuesta, y hacia fuera del centro de los dos promotores hacia los extremos del genoma adenoviral, según lo entendido por los expertos en la técnica. El promotor bidireccional conducirá así la expresión del primer transgén hacia un primer extremo del genoma adenoviral y del segundo transgén hacia el otro extremo del genoma adenoviral. Las representaciones esquemáticas de los constructos de rAd y vector rAd de la presente invención se proporcionan en las figuras 5, 7 y 8. La secuencia anotada de un promotor mCMV bidireccional representativo se proporciona en la figura 6. Se proporcionan secuencias representativas para una secuencia del promotor bidireccional mCMV que incluye intrones (SEQ ID NO:1) y un promotor mCMV excluyendo los intrones (SEQ ID NO:2). El experto sabrá que los promotores mCMV IE1 e IE2 son las secuencias promotoras activas (ver, por ejemplo, la patente europea N.º EP1601776), y que se pueden realizar mutaciones en las secuencias proporcionadas y se puede analizar la actividad del promotor mediante procedimientos de rutina. Típicamente, una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con las secuencias promotoras indicadas (sin incluir las secuencias del intrón en caso de que estuvieran presentes secuencias de intrones) seguirá teniendo actividad funcional y, por lo tanto, se considerará un promotor mCMV bidireccional. Por lo tanto, el promotor mCMV bidireccional tiene con preferencia al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con las secuencias promotoras indicadas (fuera de las secuencias de intrones en caso de que se presenten secuencias de intrones). En ciertas realizaciones, el promotor de mCMV bidireccional es 100 % idéntico a las secuencias descritas en la presente.

Las expresiones «unidos en forma operable» u «operativamente unidos» se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a la relación funcional de las secuencias de ácido nucleico con secuencias reguladoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de detención transcripcional y traduccional, y otras secuencias señal e indica que dos o más segmentos de ADN se unen entre sí de manera tal que funcionan en concierto para sus propósitos previstos. Por ejemplo, la unión operativa de las secuencias de ácido nucleico, típicamente ADN, a una secuencia reguladora o región promotora se refiere a la relación física y funcional entre el ADN y la secuencia reguladora o promotor, de manera que la transcripción de dicho ADN se inicia a partir de la secuencia reguladora o promotor, mediante una ARN polimerasa que reconoce específicamente, se une y transcribe el ADN. Con el fin de optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario modificar la secuencia reguladora para la expresión del ácido nucleico o ADN en el tipo de célula para el cual se expresa. La conveniencia o la necesidad de dicha modificación se puede determinar empíricamente.

La parte IE1 mCMV del promotor bidireccional proporciona una expresión más fuerte que la parte IE2 mCMV del promotor bidireccional (aproximadamente 10x de diferencia de nivel de expresión, según se analiza por la uciferasa), y por lo tanto el transgén para el que se desea la expresión más alta se puede colocar bajo el control de la parte IE1 mCMV del promotor bidireccional. Sin embargo, con la expresión controlada por cualquiera de las partes del promotor bidireccional, el transgén se expresa de manera potente. Como se usa en la presente, «expresado de forma potente» o «expresión potente» significa que la expresión, medida por diferentes técnicas de detección de proteínas, tales como transferencia Western o análisis FACS, es comparable o incluso mejor que la expresión de rAd monovalente que expresa un antígeno único bajo control de un promotor de hCMV. Por ejemplo, el nivel de expresión determinado por el análisis FACS de ambos antígenos del promotor mCMV bidireccional de la presente invención con preferencia es al menos el 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % del nivel de expresión del antígeno de un rAd monovalente con un promotor hCMV. En ciertas realizaciones, el nivel de expresión de ambos antígenos del mCMV bidireccional es el 100 % del nivel de expresión de un rAd monovalente con un promotor de hCMV. Además, se sabe que, a partir de rAd que expresa un antígeno único bajo el control de un promotor de hCMV, la expresión es suficiente para generar respuestas inmunitarias significativas de células T y células B. Por lo tanto, se espera que la expresión potente de dos transgenes expresados por un promotor bidireccional mCMV genere una respuesta inmune significativa de células T y células B a ambos transgenes. Por ejemplo, si los dos transgenes codifican antígenos para provocar una respuesta inmune cuando se administran a un sujeto, la expresión potente generará una respuesta inmune medible contra ambos antígenos y esa respuesta inmune será con preferencia igual o mejor que la respuesta inmune generada por un rAd con un transgén único que expresa un antígeno único bajo el control de un promotor de hCMV.

Las expresiones «secuencia codificadora», secuencia que codifica o «codificador» se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la secuencia de ácido nucleico que se transcribe (ADN) y se traduce (ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se une operativamente a las secuencias reguladoras apropiadas.

Una señal de poliadenilación, por ejemplo, la señal poliA de la hormona de crecimiento bovina (US 5.122.458) puede estar presente detrás de los transgenes. Con preferencia, cada transgén tiene una señal poliA, y con preferencia la señal poliA para el primer transgén es diferente de la señal poliA para el segundo transgén. En una realización, una primera señal de poliA es una señal de SV40 poliA, y una segunda señal de poliA es la señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina.

En realizaciones preferidas, una secuencia que comprende un intrón se coloca corriente abajo (3') del promotor y corriente arriba (5') del primer transgén, y una secuencia adicional que comprende un intrón se ubica corriente abajo del promotor y corriente arriba del segundo transgén. Estos intrones pueden ser iguales o diferentes. Un intrón como se usa en la presente tiene la función y estructura normal que se conoce en la técnica, y es una secuencia de polinucleótidos en un ácido nucleico que no codifica información para la síntesis de proteínas y se elimina antes de la traducción del ARN mensajero, mediante un procedimiento conocido como empalme. Un intrón comprende un sitio donante de empalme (extremo 5' del intrón, generalmente una secuencia GU) y un sitio aceptor de empalme (extremo 3' del intrón, generalmente una secuencia de GA). En la figura 5D se proporciona una representación esquemática de la arquitectura de los constructos según la invención que comprenden intrones. Una secuencia representativa para una secuencia del promotor mCMV bidireccional que incluye intrones se proporciona como SEQ ID NO:1. Una secuencia representativa para una secuencia del promotor mCMV bidireccional que excluye los intrones se proporciona como SEQ ID NO:2. Se puede usar cualquier intrón según la invención, y se prefiere usar intrones relativamente cortos para no ocupar demasiado espacio en un vector viral, de modo que queda más espacio para los transgenes en el adenovirus recombinante. Se prefiere usar un primer intrón en un lado del promotor bidireccional y un segundo intrón diferente en el otro lado del promotor bidireccional, es decir, cada transgén está precedido por una secuencia de intrones diferente. En ciertas realizaciones, un primer intrón es un intrón quimérico, por ejemplo, que tiene la SEQ ID NO:3. En ciertas realizaciones, un intrón adicional es un intrón ApoA1 humano, por ejemplo, que tiene la SEQ ID NO:4. El experto en la técnica sabe que hay muchos intrones diferentes disponibles y que se pueden usar. Se sabe que los intrones aumentan la expresión de proteínas, en particular *in vivo*. Una ventaja de las realizaciones de la invención donde están presentes los intrones en consecuencia es la alta expresión de los transgenes, que es muy útil para la inmunogenicidad o para la terapia génica.

Uno de los parámetros ejemplificados en los experimentos descritos en la presente es la inmunogenicidad, que es relevante para los antígenos en una aplicación de vacuna. Sin embargo, será inmediatamente claro para el experto que los niveles de expresión de transgenes también pueden ser relevantes para transgenes para los cuales una respuesta inmune no es el objetivo principal, por ejemplo, para los transgenes que se utilizan en la terapia génica. Por lo tanto, la invención se puede poner en práctica con cualquier combinación de transgenes para los que se desee la expresión de un vector adenoviral recombinante único. Por lo tanto, la identidad del transgén no es material para la presente invención, lo que es adecuado para los adenovirus que comprenden cualquier transgén. Los transgenes adecuados son bien conocidos por los expertos y, por ejemplo, pueden incluir marcos de lectura abiertos de transgén, por ejemplo, marcos de lectura abiertos que codifican polipéptidos que tienen un efecto terapéutico, por ejemplo, para fines de terapia génica, o polipéptidos contra los cuales se desea una respuesta inmune cuando el vector rAd se usa para propósitos de vacunación. Los ácidos nucleicos heterólogos particularmente preferidos son genes de interés que codifican determinantes antigénicos frente a los cuales se necesita originar una respuesta inmune. Dichos determinantes antigénicos también se denominan típicamente antígenos. Cuando se administra el adenovirus recombinante a un sujeto, se genera una respuesta inmune contra los antígenos. Cualquier antígeno deseado puede ser codificado por el vector adenovirus. En realizaciones típicas según la invención, los antígenos son péptidos, polipéptidos o proteínas de organismos que pueden causar una enfermedad o afección. Por lo tanto, en una realización preferida adicional, dicho ácido nucleico heterólogo de interés codifica un determinante inmunogénico (o antigénico). Con más preferencia, dicho determinante inmunogénico es un antígeno de una bacteria, virus, levadura o un parásito. Las enfermedades causadas por dichos organismos generalmente se conocen como «enfermedades infecciosas» (y, por lo tanto, no se limitan a organismos que «infectan» sino que también incluyen aquellos que ingresan al huésped y causan una enfermedad). Los llamados «autoantígenos», por ejemplo, antígenos tumorales también forman parte del estado de la técnica y se pueden codificar mediante ácidos nucleicos heterólogos en los adenovirus recombinantes según la presente invención. Los ejemplos no limitantes de los que se toman los determinantes antigénicos (o antígenos) son organismos causantes de malaria, tales como *Plasmodium falciparum*, organismos causantes de tuberculosis tales como *Mycobacterium tuberculosis*, levaduras o virus. En otras realizaciones preferidas, los antígenos de virus tales como los flavivirus (por ejemplo, virus del Nilo Occidental, virus de la Hepatitis C, virus de la encefalitis japonesa, virus del dengue), virus del Ébola, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de Marburg se pueden usar en composiciones según la presente invención. En una realización, dicho antígeno es la proteína CS o su parte inmunogénica de *P. falciparum* (para ejemplos de vectores de adenovirus que codifican CS, véase por ejemplo (Havenga y col., 2006; Ophorst y col., 2006); WO 2004/055187). En otra realización, el determinante antigénico es una proteína de un antígeno, o una proteína de fusión de varios antígenos de *M. tuberculosis*, tales como las proteínas Ag85A, Ag85B y/o TB10.4 o sus partes inmunogénicas (véase para la construcción y producción de tales virus de vacuna TB, por ejemplo, WO 2006/053871). En otra realización más, dicho determinante antigénico es una glicoproteína viral o una parte inmunogénica de esta, tal como GP de un filovirus, tal como el virus del Ébola o el virus de Marburg (por ejemplo, (Geisbert y col., 2011; Sullivan y col., 2006; Sullivan y col. (2003). En otras realizaciones adicionales, dicho determinante inmunogénico es de una proteína del VIH tal como gag, pol, env, nef, o sus variantes (para ejemplos de vacunas anti-VIH basadas en adenovirus, ver, por ejemplo, WO 2009/026183, WO 2010/096561, WO 2006/120034, WO 02/22080, WO 01/02607) En otras realizaciones, dicho determinante antigénico es una proteína HA, NA, M o NP, o parte inmunogénica de cualquiera de estos, del virus de la gripe (por ejemplo, (Hu y col., 2011; Zhou y col., 2010); revisión por (Vemula & Mittal, 2010). En otras realizaciones, el determinante antigénico es una proteína HA o parte inmunogénica de esta de un virus del sarampión (por ejemplo, WO 2004/037294). En otras realizaciones, el determinante antigénico es la glicoproteína del virus de la rabia (por ejemplo, (Zhou, Cun, Li, Xiang y Ertl, 2006)). En otros experimentos, el antígeno proviene de un virus sincitial respiratorio (RSV), por ejemplo, proteína RSV F (ver, por ejemplo, WO 2013/139911 y WO 2013/139916), o proteína RSV G, o ambas, u otras proteínas RSV.

En otras realizaciones, el antígeno proviene de otro virus tal como el virus del papiloma humano u otros virus, etc. El adenovirus recombinante puede codificar dos antígenos diferentes del mismo organismo. El adenovirus recombinante también puede codificar combinaciones de antígenos de diferentes organismos, por ejemplo, un primer antígeno de un primer organismo y un segundo antígeno de un segundo organismo. También es posible codificar un antígeno y, por ejemplo, un adyuvante en el mismo adenovirus, por ejemplo, un antígeno y un agonista del receptor tipo Toll (TLR), tal como un agonista de TLR3, tal como ARNDs o un mimético de este o similar (por ejemplo, WO 2007/100908). En ciertas realizaciones, el adenovirus recombinante codifica dos antígenos diferentes, cada uno bajo el control del promotor mCMV bidireccional. En otras realizaciones, el adenovirus recombinante codifica un antígeno y un modulador inmune, cada uno bajo el control del promotor mCMV bidireccional. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes secuencias o transgenes heterólogos adicionales en el adenovirus recombinante, además del primer y segundo transgén que están bajo el control del promotor de mCMV bidireccional.

La invención también proporciona un procedimiento para producir un adenovirus recombinante genéticamente estable que comprende un primer y un segundo transgén cada uno de los cuales se expresa de manera potente cuando el adenovirus infecta una célula blanco, el procedimiento que comprende:

preparar un constructo que comprende un promotor mCMV bidireccional operativamente unido a un primer transgén en una dirección y a un segundo transgén en la dirección opuesta, e incorporar dicho constructo en el genoma del adenovirus recombinante. La preparación del constructo como tal abarca el uso de procedimientos estándar de clonación molecular (ver, por ejemplo, (Holterman y col., 2004; Lemckert y col., 2006; Vogels y col., 2003); Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM y col., eds, 1987; la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR2: A Practical Approach, MacPherson MJ, Hams BD, Taylor GR, eds, 1995), como saben los expertos en la técnica y se realizan de forma rutinaria en el campo de la tecnología de adenovirus recombinante, y se ejemplifican en la presente. El promotor de mCMV bidireccional tiene las características descritas anteriormente y se puede obtener mediante procedimientos de rutina (ver, por ejemplo, la patente europea N.º EP1601776). Por conveniencia, la persona experta puede manipular el genoma del adenovirus mediante clonación en fragmentos más pequeños, por ejemplo, en una primera parte para la parte izquierda del genoma hasta la región E1 para una fácil manipulación e introducción de los transgenes en forma de plásmido y una segunda parte más grande para el resto del genoma que después de la recombinación con la primera parte produce el genoma de adenovirus completo (ver, por ejemplo, WO 99/55132).

El rAd de la presente invención tiene la ventaja de que puede expresar dos transgenes y permanece genéticamente estable, a diferencia de los adenovirus preparados por los diversos enfoques alternativos para expresar dos transgenes que se proporcionan en la técnica anterior. Por lo tanto, el promotor de mCMV bidireccional resuelve el problema de la inestabilidad genética de los adenovirus que expresan dos transgenes.

Para medir la estabilidad genética, los rAd se rescatan y se pasan a una línea celular apropiada, por ejemplo, la línea celular auxiliar PER.C6®. El ADN viral se aísla en ciertos números de pasaje y la integridad del genoma rAd se puede analizar mediante uno o más de los siguientes: análisis de PCR para detectar la presencia o ausencia de bandas de supresión, digestión de restricción del genoma rAd para detectar la presencia o ausencia de diferencias en los fragmentos de restricción, y/o secuenciación del genoma rAd o de los productos de PCR del genoma rAd para detectar la presencia o ausencia de mutaciones en las secuencias rAd. Con respecto al rAd de la presente invención, «genéticamente estable» significa que la secuencia de nucleótidos no cambia de los plásmidos utilizados para la generación del rAd en las etapas de producción posteriores del rAd, de modo que rAd que expresa dos transgenes tiene la misma estabilidad genética que un rAd comparable con un transgén único (detrás de un promotor de hCMV) como adecuado para producciones por lotes a gran escala. Por ejemplo, el análisis de PCR que usa cebadores que flanquean el casete de expresión no muestra fragmentos de supresión (bandas) en comparación con los números de pasaje anteriores del adAd o el material de partida y/o la secuenciación del producto de la PCR de las regiones E1, E3 y E4 confirma que la secuencia de nucleótidos no cambia. La estabilidad genética se evalúa exhaustivamente en este estudio en comparación con otros procedimientos de prueba, tales como las digestiones de prueba en un lote de virus producido único. La sensibilidad del ensayo aumenta por los siguientes medios: varias poblaciones virales (placas) se aíslan y se someten a pasajes extendidos. El pasaje extendido, combinado con un análisis de PCR que utiliza cebadores que flanquean el casete de expresión, permite la detección de una pequeña proporción de mutantes de supresión en la población rAd que se pueden pasar por alto usando otros procedimientos. Además, el análisis de secuenciación se realiza para excluir la aparición de mutaciones puntuales, tales como la introducción de codones de detención en el marco de lectura abierto del transgén. Más específicamente, dado que las mutaciones virales siempre presentan un evento casual, una placa puede ser estable, mientras que otra puede presentar una banda de supresión. Por lo tanto, para evaluar correctamente la estabilidad genética, se deben analizar varias poblaciones virales (placas). En el caso de que se produzca una mutación, lo que permite que el vector se replique de manera más eficiente que el vector progenitor, esto puede llevar a un crecimiento excesivo de la versión mutante, que a menudo solo se observa después del pasaje extendido como se describe en este estudio. Con preferencia, los rAd de la presente invención son genéticamente estables para al menos hasta 10 pasajes, y aún con más preferencia para al menos hasta 13 pasajes en el sistema de prueba utilizado, de modo que el virus es suficientemente estable para campañas de producción a gran escala.

El adenovirus recombinante producido según los procedimientos de la invención se pueden preparar según las

realizaciones descritas anteriormente para el adenovirus recombinante.

- 5 La descripción también proporciona un procedimiento para expresar al menos dos transgenes en una célula, el procedimiento que comprende proporcionar a la célula un adenovirus recombinante según la invención. Proporcionar una célula un adenovirus recombinante se puede realizar mediante la administración del adenovirus a un sujeto, o mediante la introducción (por ejemplo, una infección) del adenovirus *in vitro* o *ex vivo* en una célula. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un vector adenoviral recombinante para usar en la expresión de al menos dos transgenes en una célula, por ejemplo, mediante la administración del adenovirus recombinante a un sujeto.
- 10 La descripción también proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune contra al menos dos antígenos, que comprende administrar a un sujeto un adenovirus recombinante según la invención. La invención también proporciona un adenovirus recombinante según la invención para uso en la inducción de una respuesta inmune contra al menos dos antígenos.
- 15 La invención también proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende el genoma de un adenovirus recombinante de la invención. El experto sabrá que esto también puede ser una combinación de al menos dos moléculas de ADN recombinante diferentes que juntas pueden formar la molécula de ADN recombinante único de la invención. Estas moléculas son útiles para manipular el genoma y crear nuevos adenovirus recombinantes. El genoma codifica las proteínas que se requieren para la replicación y el empaquetamiento de adenovirus en células permisivas.
- 20 El término «aproximadamente» para valores numéricos como se usa en la presente descripción significa el valor  $\pm 10\%$ .
- 25 Las células productoras se cultivan para aumentar el número de células y virus y/o los títulos de virus. El cultivo de una célula se realiza para permitirle metabolizar, y/o crecer y/o dividir y/o producir virus de interés según la invención. Esto se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, proporcionar nutrientes para la célula, por ejemplo, en los medios de cultivo apropiados. Los medios de cultivo adecuados son bien conocidos por los expertos y, en general, se pueden obtener de fuentes comerciales en grandes cantidades, o fabricar a medida según los protocolos estándares. El cultivo se puede obtener, por ejemplo, en platos, botellas de cultivo rotatorias o en biorreactores, utilizando sistemas por lotes, alimentados por lotes, continuos y similares. Se conocen las condiciones adecuadas para cultivar células (ver, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editors (1973), y R.I. Freshney, Culture of animal cells: A manual of basic technique, cuarta edición (Wiley-Liss Inc., 2000, ISBN 0-471-34889-9).
- 30 Típicamente, el adenovirus se expondrá a la célula productora apropiada en un cultivo, lo que permite la captación del virus. Usualmente, la agitación óptima está entre aproximadamente 50 y 300 rpm, normalmente entre 100 y 200, por ejemplo, aproximadamente de 150, la OD típica es 20-60 %, por ejemplo, 40 %, el pH óptimo está entre 6,7 y 7,7, la temperatura óptima entre 30 y 39 °C, por ejemplo, 34-37 °C y el MOI óptimo entre 5 y 1000, por ejemplo, aproximadamente 50-300. Típicamente, el adenovirus infecta las células productoras espontáneamente, y poner las células productoras en contacto con partículas rAd es suficiente para la infección de las células. En general, se añade un *stock* de semillas de adenovirus al cultivo para iniciar la infección, y posteriormente el adenovirus se propaga en las células productoras. Todo esto es rutina para el experto en la técnica.
- 35 Después de la infección de un adenovirus, el virus se replica dentro de la célula y, por lo tanto, se amplifica, un procedimiento denominado en la presente como propagación de adenovirus. La infección por adenovirus finalmente produce la lisis de las células que se están infectando. Las características líticas del adenovirus, por lo tanto, permiten dos modos diferentes de producción de virus. El primer modo es la recolección de virus antes de la lisis celular, que emplea factores externos para lisar las células. El segundo modo es la recolección del sobrenadante del virus después de la (casi) completa lisis celular por el virus producido (ver, por ejemplo, la patente US. 6.485.958, que describe la recolección de adenovirus sin la lisis de las células huésped por un factor externo). Se prefiere emplear factores externos para lisar activamente las células para recolectar el adenovirus.
- 40 Los procedimientos que se pueden usar para la lisis celular activa son conocidos por los expertos en la técnica, y se han descrito, por ejemplo, en WO 98/22588, pág. 28-35. Los procedimientos útiles a este respecto son, por ejemplo, congelación-descongelación, cizallamiento sólido, lisis hipertónica y/o hipotónica, cizallamiento del líquido, sonicación, extrusión a alta presión, lisis del detergente, combinaciones de los anteriores y similares. En una realización, las células se lisan usando al menos un detergente. El uso de un detergente para lisis tiene la ventaja de que es un procedimiento fácil y que es fácilmente escalable.
- 45 Los detergentes que se pueden usar, y la forma en que se emplean, generalmente los conoce el experto en la técnica. Varios ejemplos se discuten, por ejemplo, en el WO 98/22588, pág. 29-33. Los detergentes pueden incluir detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos. La concentración del detergente puede variar, por ejemplo, dentro del rango de aproximadamente 0,1 %-5 % (p/p). En una realización, el detergente usado es Triton X-100.
- 50 La nucleasa se puede emplear para eliminar contaminantes, es decir, principalmente de la célula productora, ácidos nucleicos. Los ejemplos de nucleasas adecuadas para uso en la presente invención incluyen Benzonase®,

Pulmozyme®, o cualquier otra ADNasa y/o ARNasa comúnmente usada en la técnica. En realizaciones preferidas, la nucleasa es Benzonase®, que hidroliza rápidamente los ácidos nucleicos mediante la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos, de este modo se reduce la viscosidad del lisado celular. Benzonase® se puede obtener comercialmente de Merck KGaA (código W214950). La concentración donde se emplea la nucleasa con preferencia está dentro del rango de 1-100 unidades/ml. Alternativamente, o además del tratamiento con nucleasa, también es posible precipitar selectivamente el ADN de la célula huésped a partir de las preparaciones de adenovirus durante la purificación de adenovirus, usando agentes precipitantes selectivos tales como el bromuro de domifeno (ver, por ejemplo, US 7.326.555; (Goerke, To, Lee, Sagar, & Konz, 2005); WO 2011/045378; WO 2011/045381).

Los procedimientos para recolectar adenovirus a partir de cultivos de células productoras se han descrito ampliamente en WO 2005/080556.

En ciertas realizaciones, el adenovirus recolectado se purifica adicionalmente. La purificación del adenovirus se puede realizar en varias etapas que comprenden clarificación, ultrafiltración, diafiltración o separación con cromatografía como se describe en, por ejemplo, WO 05/080556. La clarificación se puede realizar mediante una etapa de filtración, que elimina los residuos celulares y otras impurezas del lisado celular. La ultrafiltración se utiliza para concentrar la solución del virus. La diafiltración, o intercambio de *buffer*, usando ultrafiltros es una forma de eliminación e intercambio de sales, azúcares y similares. El experto en la técnica sabe cómo encontrar las condiciones óptimas para cada etapa de purificación. También WO 98/22588 describe procedimientos para la producción y purificación de vectores adenovirales. Los procedimientos comprenden cultivar células huésped, infectar las células huésped con adenovirus, recolectar y lisar las células huésped, concentrar el lisado crudo, intercambiar el *buffer* del lisado crudo, tratar el lisado con nucleasa y purificar más el virus usando cromatografía.

Con preferencia, la purificación emplea al menos una etapa de cromatografía, como se describe, por ejemplo, en WO 98/22588, pág. 61-70. Se han descrito muchos procedimientos para la purificación adicional de los adenovirus, donde las etapas cromatografía se incluyen en el procedimiento. El experto en la técnica estará enterado de estos procedimientos y puede variar la forma exacta de emplear las etapas cromatográficas para optimizar el procedimiento. Por ejemplo, es posible purificar adenovirus mediante etapas de cromatografía de intercambio aniónico, véase por ejemplo WO 2005/080556. Muchos otros procedimientos de purificación de adenovirus se han descrito y están al alcance de las personas expertas. Otros procedimientos para producir y purificar adenovirus se describen en, por ejemplo, WO 00/32754, WO 04/020971, US 5.837.520, US 6.261.823 y WO 2006/108707.

Para administrar a seres humanos, la invención puede emplear composiciones farmacéuticas que comprenden el rAd y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente contexto, el término «farmacéuticamente aceptable» significa que el portador o excipiente, en las dosis y concentraciones empleadas, no causará ningún efecto no deseado o nocivo en los sujetos a los que se administran. Tales portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, AR Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides y Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000]). El rAd purificado con preferencia se formula y administra como una solución estéril, aunque también es posible utilizar preparaciones liofilizadas. Las soluciones estériles se preparan por filtración estéril o por otros procedimientos conocidos *per se* en la técnica. Las soluciones luego se liofilizan o se rellenan en recipientes de dosificación farmacéutica. El pH de la solución generalmente está en el rango de pH 3,0 a 9,5, por ejemplo, pH 5,0 a 7,5. El rAd normalmente está en una solución que tiene un *buffer* adecuado, y la solución de rAd también puede contener una sal. Opcionalmente puede estar presente un agente estabilizante, tal como albúmina. En ciertas realizaciones, se añade detergente. En ciertas realizaciones, el rAd se puede formular en una preparación inyectable. Estas formulaciones contienen cantidades efectivas de rAd, son soluciones líquidas estériles, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas y, opcionalmente, contienen estabilizantes o excipientes. Una vacuna contra el adenovirus también se puede aerosolizar para administración intranasal (véase, por ejemplo, WO 2009/117134).

Por ejemplo, el adenovirus se puede almacenar en el *buffer* que también se usa para el estándar mundial de adenovirus (Hoganson y col., 2002): Tris 20 mM, pH 8, NaCl 25 mM, glicerol 2,5 %. Otro *buffer* de formulación útil adecuado para la administración a seres humanos es Tris 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NaCl 25 mM, sacarosa 10 % p/v, polisorbato-80 0,02 % p/v. Otro *buffer* de formulación que es adecuado para el adenovirus recombinante comprende un *buffer* de citrato 10-25 mM pH 5.9-6.2, hidroxipropil-beta-ciclodextrina 4-6 % (p/p) (HBCD), NaCl 70-100 mM, polisorbato-80 0,018-0,035 % (w/w), y opcionalmente etanol 0,3-0,45 % (p/p). Obviamente, se pueden usar muchos otros *buffer*, y se conocen varios ejemplos de formulaciones adecuadas para el almacenamiento y para la administración farmacéutica de preparaciones de (adeno)virus purificados, que incluydonde se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente europea N.º 0853660, patente US. 6.225.289 y en las solicitudes de patente internacional WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592, WO 03/061708.

En ciertas realizaciones, una composición que comprende el adenovirus también comprende uno o más adyuvantes. Los adyuvantes son conocidos en la técnica por aumentar aún más la respuesta inmune a un determinante antigénico aplicado, y las composiciones farmacéuticas que comprenden adenovirus y adyuvantes adecuados se describen, por ejemplo, en WO 2007/110409. Los términos «adyuvante» y «inmunoestimulante» se usan de manera intercambiable

en la presente, y se definen como una o más sustancias que causan la estimulación del sistema inmune. En este contexto, se usa un adyuvante para potenciar una respuesta inmune a los vectores de adenovirus de la invención. Los ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen sales de aluminio tales como hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio; composiciones de aceite-emulsión (o composiciones de aceite en agua), que incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (ver, por ejemplo, WO 90/14837); formulaciones de saponina, tales como por ejemplo QS21 y complejos inmunoestimulantes (ISCOMS) (ver, por ejemplo, US 5.057.540; WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762, WO 2005/002620); derivados bacterianos o microbianos, cuyos ejemplos son monofosforil lípido A (MPL), MPL 3-O-desacilado (3dMPL), oligonucleótidos que contienen el motivo CpG, toxinas bacterianas ribosilantes ADP o mutantes de estos, tal como enterotoxina LT lábil al calor de *E. coli*, CT toxina del cólera, y similares. También es posible utilizar un adyuvante codificado por vector, por ejemplo, mediante el uso de ácido nucleico heterólogo que codifica una fusión del dominio de oligomerización de la proteína de unión a C4 (C4bp) al antígeno de interés (Ogun, Dumon-Seignovert, Marchand, Holder & Hill, 2008), o ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista del receptor tipo toll (TLR), tal como un agonista de TLR3 tal como ARNs (ver, por ejemplo, WO 2007/100908) o similares. Tal rAd según la invención puede codificar, por ejemplo, un antígeno de interés en un lado del promotor bidireccional y un agonista de TLR3 en el otro lado del promotor bidireccional. Tales rAd son particularmente adecuados para la administración a través de una vía de la mucosa, por ejemplo, administración oral (ver, por ejemplo, WO 2007/100908). En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención comprenden aluminio como adyuvante, por ejemplo, en forma de hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de aluminio y potasio, o combinaciones de estos, en concentraciones de 0,05 a 5 mg, por ejemplo de 0,075-1,0 mg, de contenido de aluminio por dosis.

En otras realizaciones, las composiciones no comprenden adyuvantes.

Una composición farmacéutica según la invención en ciertas realizaciones puede ser una vacuna.

Las composiciones de adenovirus se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. La dosis total del adenovirus proporcionada a un sujeto durante una administración puede variarse según sea conocido por el profesional experto, y generalmente está entre  $1 \times 10^7$  partículas virales (vp) y  $1 \times 10^{12}$  vp, con preferencia entre  $1 \times 10^8$  vp y  $1 \times 10^{11}$  vp, por ejemplo entre  $3 \times 10^8$  y  $5 \times 10^{10}$  vp, por ejemplo entre  $10^9$  y  $3 \times 10^{10}$  vp.

La administración de composiciones de adenovirus se puede realizar usando vías de administración estándar. Las realizaciones no limitantes incluyen la administración parenteral, tal como mediante inyección, por ejemplo, administración intradérmica, intramuscular, etc. o subcutánea o transcutánea, o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, y similares. En una realización, una composición se administra por inyección intramuscular, por ejemplo en el músculo deltoides del brazo, o vasto lateral del músculo del muslo. El experto en la técnica conoce las diversas posibilidades para administrar una composición, por ejemplo una vacuna para inducir una respuesta inmune al antígeno(s) en la vacuna.

Un sujeto como se usa en la presente con preferencia es un mamífero, por ejemplo un roedor, por ejemplo un ratón, o un primate no humano, o un ser humano. Con preferencia, el sujeto es un sujeto humano.

También es posible proporcionar una o más administraciones de refuerzo de una o más vacunas contra el adenovirus. Si se realiza una vacunación de refuerzo, por lo general, dicha vacunación de refuerzo se administrará al mismo sujeto en un momento entre una semana y un año, con preferencia entre dos semanas y cuatro meses, después de administrar la composición al sujeto por primera vez (que en estos casos se denomina «vacunación de estimulación»). En regímenes de refuerzo alternativos, también es posible administrar diferentes vectores, por ejemplo uno o más adenovirus de diferentes serotipos, u otros vectores, tales como MVA, o ADN, o proteína, a sujeto como una vacuna de estimulación o de refuerzo.

Varias publicaciones, que pueden incluir patentes, solicitudes publicadas, artículos técnicos y artículos académicos, se citan a lo largo de la memoria descriptiva entre paréntesis, y las citas completas de cada uno se pueden encontrar al final de la memoria descriptiva.

Otras realizaciones, características y ventajas de la invención se ilustran adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos. Los ejemplos no limitan la invención de ninguna manera. Simplemente sirven para clarificar la invención.

## EJEMPLOS

Sin una descripción adicional, se cree que un experto en la técnica, usando la descripción anterior y los siguientes ejemplos ilustrativos, puede realizar y utilizar la presente invención y practicar los procedimientos reivindicados. Los siguientes ejemplos de trabajo, por lo tanto, señalan específicamente ciertas realizaciones de la presente invención, y no se deben interpretar como limitantes de ninguna manera el resto de la descripción.

**Ejemplo [Comparativo] 1: Preparación y caracterización de vectores rAd35 y rAd26 de replicación incompetente monovalentes**

### Generación de plásmidos del adaptador E1 que contienen glicoproteínas de Filovirus

Los genes codificadores de la glicoproteína del filovirus para el virus de Marburg Angola (MARV) (número de acceso de GenBank® Q1PD50), el virus del Ébola Zaire cepa Mayinga (EBOV) (número de acceso del GenBank® AAN37507.1 con una mutación T544I) y el virus del Ébola Sudán Gulu (SEBOV) (número de acceso de GenBank® YP\_138523 con G2E) se optimizó genéticamente para la expresión humana y se clonó en plásmidos pAdapt35 o pAdapt26 (Vogels y col. 2007; Abbink y col., 2007), utilizando los sitios de restricción HindIII y XbaI. Una secuencia de Kozak (5 'GCCACC 3') se incluyó directamente en el frente del codón de inicio ATG, y se agregaron dos codones de detención (5 'TGA TAA 3') al final de las secuencias codificadoras. Como se describe en la presente, los adenovirus y vectores recombinantes se denominan generalmente rAd o vectores rAd y más específicamente como rAd35 o rAd26.

### Cultivo celular:

Las células PER.C6® (Fallaux y col., 1998) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero bovino fetal 10 % (FBS), suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

### Generación, infecciones y pasaje del adenovirus.

Todos los adenovirus se generaron en células PER.C6® mediante recombinación homóloga y se produjeron como se describió anteriormente (para rAd35: (Havenga y col., 2006); para rAd26: (Abbink y col., 2007)). En resumen, las células PER.C6® se transfectaron con plásmidos que codifican el vector rAd, utilizando Lipofectamine según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Life Technologies). Para el rescate de vectores rAd35 que llevan el casete de expresión del transgén de la glicoproteína del filovirus, se utilizaron los plásmidos pAdApt35 y cósmido pWE/Ad35.pIX-rITR.dE3.5orf6, mientras que para los vectores rAd26, se usaron los plásmidos pAdApt y cósmido pWE.Ad26.dE3.5orf6s. Las células se recolectaron un día después del efecto citopático completo (CPE), se congelaron y descongelaron, se centrifugaron durante 5 minutos a 3.000 rpm y se almacenaron a -20 °C. A continuación, los virus se purificaron en placa y se amplificaron en PER.C6® cultivadas en un pocillo único de una placa de cultivo de tejidos de 24 multipocillos. Se llevó a cabo una amplificación adicional en PER.C6® cultivadas utilizando un matraz de cultivo de tejidos T25.

### Prueba de estabilidad genética de los vectores adenovirales en células PER.C6®.

La prueba de estabilidad genética de los vectores de vacunas se realizó para asegurar la estabilidad genética en el procedimiento de producción, lo que implica varios pasajes en las células PER.C6® como se ilustra en la figura 1B. La generación, purificación de la placa y expansión al formato T25 de los vectores de vacunas recombinantes se lograron como se describió anteriormente. En resumen, los virus recombinantes se generaron mediante transfecciones de plásmidos en la línea celular que complementa E1 PER.C6® y se purificaron en placa. Se seleccionaron 5 placas para aumentar la escala de 24 multipocillos (MW24) a un matraz T25 (rAd35 p3/rAd26 p4). Posteriormente, se infectaron nuevas células PER.C6® en formato T25 hasta el pasaje viral número 13 (rAd35 p13/rAd26 p13). La propagación de los virus se realizó utilizando un volumen infeccioso predeterminado que puede dar un efecto citopático completo 2 días después de la infección, que se determinó retrospectivamente que está en un rango de relación de partículas de virus por célula de 50 para rAd35 y 900 para rAd26. El ADN viral se aisló del material p13 y se analizó para detectar la presencia del casete de expresión del transgén completo mediante análisis por PCR. Los vectores de vacuna se propagaron hasta el pasaje número 13 en células PER.C6®. La propagación se realizó de manera de obtener un CPE completo dos días después de la infección. Los virus rAd35 se recolectaron 2 días después del CPE completo, mientras que los virus rAd26 se recolectaron un día después del CPE completo. El ADN viral se aisló en el pasaje 2, el pasaje 5, el pasaje 10 y el pasaje 13, y la ausencia de supresiones se analizó mediante análisis de PCR utilizando cebadores que flanquean el casete de expresión del transgén. La ausencia de mutantes por supresión se definió mediante los siguientes parámetros: el tamaño de la banda del producto de la PCR corresponde al control positivo (producto de la PCR del plásmido utilizado para el rescate del virus), no hay bandas adicionales por debajo del producto de la PCR esperado (a menos que las bandas adicionales muestren ser productos de la PCR no específicos porque también están presentes en el control positivo), ensayo aprobado: no hay banda en el control de H<sub>2</sub>O de PCR. Para confirmar adicionalmente la estabilidad genética, se secuenciaron el producto de PCR del casete de expresión más las regiones flanqueantes de algunas placas.

Se sabe que los vectores rAd.E1 monovalentes o de inserto único que utilizan diseños genéticos, como se muestra en la figura 1A, son genéticamente estables en la fabricación a gran escala, e incluyen varias etapas de propagación para aumentar la escala en una línea celular de producción, tal como las células PER.C6®. Para imitar estas etapas de propagación requeridas para producciones a gran escala de ensayos clínicos o material a escala comercial, se generaron vectores adenovirales mediante transfección en células PER.C6® y se aislaron clones virales mediante purificaciones de placa. Se seleccionaron cinco placas por virus y las poblaciones virales se pasaron en forma seriada en células PER.C6® sembradas en matraces T25. En contraste con las pruebas de estabilidad genética de solo un lote, el pasaje seriado de cinco placas en paralelo a p13 permite una evaluación más factible de la estabilidad del genoma rAd. Este enfoque particular para evaluar la estabilidad genómica de un vector rAd es más valioso por varias

razones. La primera es la resolución agregada de observar varios clones en comparación con la evaluación de un solo clon rAd. La potencia del ensayo se aumenta adicionalmente mediante el pasaje seriado de varios clones rAd hasta o incluso más allá de p13, que no se puede comparar simplemente observando la estabilidad genética de «un» lote. Esto último se debe principalmente al hecho de que los lotes, en algunos casos, se pueden producir con un número de pasaje «bajo». Por último, pero no menos importante, el análisis de los genomas rAd pasados con una PCR que utiliza cebadores que flanquean el casete de expresión E1 aumenta la sensibilidad del ensayo y permite la detección de mutantes por supresión pequeña en la población rAd, que se pueden pasar por alto mediante la digestión con enzimas de restricción del ADN viral. Se confirmó que rAd35.E1.EBOV, rAd35.E1.SEBOV, rAd35.E1.MARV y rAd26.E1.EBOV eran estables en el pasaje 13 (p13), sin bandas de supresión según lo determinado por el análisis de PCR (figura 1C). Cabe señalar que para los 4 virus, en realidad se analizaron 10 placas, pero solo se muestran 5 para cada virus en la figura 1C. Los resultados de estabilidad genética para los vectores rAd35.E1 y rAd26.E1 monovalentes se utilizaron como punto de referencia para las pruebas de estabilidad genética de vectores adenovirales bivalentes.

### **Ejemplo [Comparativo] 2: Preparación y caracterización de vectores bivalentes rAd35 y rAd26 usando la estrategia E1-E3**

Como primer ejemplo de una estrategia publicada para generar vectores adenovirales bivalentes, la estrategia E1-E3 se analizó como se muestra en la figura 2. La figura 2A muestra el diseño genético de los vectores virales generados para los vectores rAd35 y rAd26, donde un casete de expresión se coloca en la región E1 y un casete de expresión adicional se coloca en la región E3. Los casetes rAd35 E3 se crearon en la orientación invertida como se muestra en la figura 2A. Ambos casetes E1 y E3 albergan el promotor CMV humano idéntico, pero con señales de poliadenilación heterólogas (Vogels y col., 2007). Como primer vector viral, rAd35.E1.EBOV-E3.SEBOV que codifica las glicoproteínas de filovirus derivadas del virus del Ébola Zaire (EBOV) y el virus del Ébola Sudan Gulu (SEBOV), se preparó mediante transfección en células PER.C6®, se purificó en placa y se seleccionaron cinco placas por virus para las pruebas de estabilidad genética en el pasaje 5 (p5), pasaje 10 (p10) y pasaje 15 (p15). La figura 2B muestra los resultados de las PCR de identidad realizadas en p5, p10 y p15. Las bandas de supresión se detectan en la PCR de identidad E1/E3 en 3 de las 5 placas en p10. A p15, la mayoría de la población de virus de todas las placas analizadas muestra supresiones parciales del casete de expresión en E3. Con el fin de probar el efecto de los antígenos usados o de la combinación específica de antígenos, se rescataron varios otros vectores adenovirales bivalentes E1-E3 y se analizaron para determinar la estabilidad genética. La tabla 1 muestra que todos los vectores adenovirales bivalentes E1-E3 listados se podrían rescatar, sin embargo, todos los vectores analizados eran genéticamente inestables según el análisis de PCR. En total, se rescataron con éxito seis vectores modificados con rAd35.E1-E3, sin embargo, todos mostraron inestabilidad genética tal como se analizó mediante PCR de identidad E3. Por el contrario, los dos vectores modificados rAd26 E1.E3 analizados que contienen las glicoproteínas de Filovirus en E1 y E3 o la glicoproteína de Filovirus y eGFP, estaban gravemente deteriorados en la eficiencia de propagación y, por lo tanto, eran difíciles de expandir. Ambos vectores mostraron inestabilidad genética cuando se analizaron con la PCR de identidad. Esta inestabilidad genética se observó para los vectores bivalentes que expresan dos glicoproteínas de Filovirus y para los vectores bivalentes que expresan una glicoproteína de Filovirus y eGFP. Por lo tanto, la inestabilidad genética observada no se puede atribuir a la presión de selección inducida por la toxicidad. La conclusión es que la estrategia bivalente inversa E1-E3 en rAd26 y rAd35 como se indica en la figura 2 no es adecuada para la producción a gran escala de vectores adenovirales bivalentes, a pesar de informes anteriores de la bibliografía que sugieren que son adecuados para la producción a gran escala. Una posible explicación es que los informes de la bibliografía anterior se basaron en pruebas limitadas y la estabilidad genética no se analizó de manera rigurosa y sistemática como se describe aquí. En particular, se debe tener en cuenta que el análisis de la PCR después del pasaje extendido utilizando cebadores que flanquean el casete de expresión, como se usa en los estudios actuales para medir la estabilidad genética, aumenta la sensibilidad del ensayo y permite la detección de mutantes por supresión pequeñas la población rAd que se pueden pasar por alto usando otros procedimientos, tales como los digestos de restricción del genoma rAd. La estrategia inversa E1-E3 recientemente informada que utiliza promotores heterólogos en rAd5 describe resultados similares con respecto a la capacidad de rescate de los vectores (Small y col., 2014). Sus resultados muestran que la inserción de casetes de expresión con promotores heterólogos en la orientación de las agujas del reloj 5'-3' no se pudo rescatar. Sin embargo, el mismo casete de expresión insertado en la orientación 3'-5' 'en el sentido contrario a las agujas del reloj, produjo vectores que se pueden rescatar en células HEK293. La estabilidad genética de algunos de los vectores también se demostró mediante digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel del genoma viral después del primer y décimo pasajes en células HEK293.

### **Ejemplo [Comparativo] 3: Preparación y caracterización de vectores rAd35 bivalentes con un casete de expresión bicistrónico en E1**

Se probó una estrategia E1-F2A (representada en la figura 3A) como una segunda estrategia para generar vectores adenovirales bivalentes. Para este fin, se clonaron dos genes en la región E1 corriente abajo de un promotor de CMV humano, separados por un sitio de reconocimiento de furina y el péptido 2A de autoescisión derivado del virus de la fiebre aftosa, lo que produjo la transcripción de un transcripto de ARNm que se está separando por omisión de ribosomas (Donnelly y col., 2001; Szymczak y col., 2004). Se generaron tres virus diferentes rAd35.E1.eGFP-F2A-Luc, rAd35.E1.Luc-F2A-eGFP y rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV en PER.C6® y propagaron en PER.C6 hasta el pasaje 13. 5 placas de tres virus diferentes propagaron en las células PER.C6 y se analizaron mediante análisis de PCR para determinar la estabilidad genética. De mostró que los virus son genéticamente estables en el pasaje 10 (datos no

mostrados), pero en el pasaje 13 (p13), 2 de las placas de rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV mostraron bandas de supresión muy débiles (figura 3B). Las bandas de supresión se observaron más claramente en imágenes de gel de agarosa altamente sobreexpuestas, lo que confirma que una proporción de estas poblaciones virales había suprimido parcialmente el casete de expresión bivalente mediante p13. En comparación con la estrategia bivalente E1-E3 analizada anteriormente, los vectores virales E1-F2A eran genéticamente más estables sin bandas de supresión hasta el pasaje 10 y podían propagarse de manera eficiente.

Por lo tanto, para permitir una evaluación adicional de los virus con el diseño E1-F2A bicistrónico, en particular para evaluar los niveles de expresión y la inmunogenicidad de los dos transgenes, se utilizó el material T25 del virus Ad35.E1.MARV-F2A-SEBOV generado para inocular un matraz de cultivo de tejidos T175. Del lisado crudo T175, se usaron de 3 a 5 ml para inocular matraces de cultivo de tejidos de triple capa 20 × T175 que contienen 70% de capas confluentes de células PER.C6®. El virus se purificó luego usando un procedimiento de purificación de CsCl de dos etapas y el virus purificado se almacenó en alícuotas a -85 °C.

Además, se generaron vectores virales utilizando una secuencia de TaV, una secuencia 2A derivada del virus Thossea assigna y que expresa eGFP y luciferasa, rAd35.E1.eGFP-TaV-Luc, rAd35.E1.Luc-TaV-eGFP. El análisis de expresión por transferencia Western mostró una reducción similar en la expresión como se observó para los constructos F2A. Las pruebas de estabilidad genética también mostraron resultados comparables a los de los constructos F2A. No se prosiguió este enfoque.

Tanto para la terapia génica como para las aplicaciones de vacunas, la expresión potente del transgén codificado es un requisito previo, por ejemplo, para que una vacuna sea lo suficientemente inmunogénica, debe haber una expresión suficiente de los transgenes (antígenos) para estimular respuestas de las células T y/o las células B. Debido a que los vectores de vacuna de inserto único como se presentan en la figura 1 son altamente inmunogénicos en varios modelos animales y en seres humanos, estos vectores de inserto único se utilizaron como punto de referencia para la expresión potente en un ensayo *in vitro*. Las células A549 se infectaron con vectores de vacuna purificados con CsCl a 1000, 2500 y 5000 partículas virales por célula (VP/célula). La expresión del transgén se analizó mediante transferencia Western usando anticuerpos primarios específicos del transgén. La figura 3C muestra que el vector rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV dirige la expresión transgénica reducida de ambos transgenes codificados en comparación con la misma VP/célula de rAd35.MARV o rAd35.SEBOV.

Debido a que las glicoproteínas (GP) de los filovirus, MARV y SEBOV, son proteínas transmembrana de superficie, las modificaciones correctas postraduccionales y el tráfico se consideran importantes para la inmunogenicidad. Por lo tanto, la expresión en la superficie celular de las células infectadas con rAd se analizó en un ensayo de expresión en la superficie celular FACS. Para este fin, las células A549 se infectaron con rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV bivalente que expresaba tanto MARV como SEBOV y con una mezcla de los dos vectores monovalentes rAd35.MARV y rAd35.SEBOV como control de referencia. Las células se infectaron con una cantidad creciente de virus (111, 333 y 1000 VP/célula), se recolectaron 48 horas después de la infección (48 hpi) y las GP en la superficie celular se tiñeron usando suero de ratón originado contra las GP respectivas. Se usó un anticuerpo secundario acoplado a APC anti-ratón para facilitar la detección de las células por FACS. Se contó el % de células positivas para APC. Los resultados presentados en la figura 3D muestran que se mantiene el procesamiento y el tráfico correctos de las GP, sin embargo, el análisis FACS también confirmó la expresión reducida de ambos transgenes para rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV en comparación con una mezcla de rAd35.MARV y rAd35.SEBOV.

Para analizar la respuesta inmune inducida contra los transgenes codificados por rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV bivalente, se inmunizaron ratones con el vector de vacuna purificada, utilizando la mezcla de los dos vectores monovalentes rAd35.MARV y rAd35.SEBOV como control de referencia. En este estudio, los animales se distribuyeron en grupos experimentales de 10 ratones. Se administró por vía intramuscular una dosis única de  $1 \times 10^9$  partículas de vector (VP) por vector. Para compensar un posible efecto adyuvante en ratones inyectados con 2 vectores de inserto único (que reciben así  $2 \times 10^9$  VP por animal), los animales inyectados con rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV también se les administraron  $1 \times 10^9$  VP de vector Ad35.vacío (en consecuencia todos los ratones recibieron  $2 \times 10^9$  VP total por animal). La lectura de la respuesta inmune celular y humoral fue un ELISPOT y ELISA a las 8 semanas después de la inmunización.

El ensayo ELISPOT se utiliza para determinar el número relativo de células T que secretan IFN $\gamma$  específicas de proteína GP en el bazo, y se realiza esencialmente como se describe en (Radošević y col., 2010), con algunas adaptaciones. En resumen, para la estimulación en ELISPOT se utilizaron tres grupos diferentes de mezclas de péptidos de 15 mer por antígeno de Filovirus; una mezcla de consenso que contiene péptidos similares entre las glicoproteínas del Filovirus Ébola o Marburg, la Mezcla 1 que contiene los péptidos restantes de la mitad N-terminal de las glicoproteínas específicas y la Mezcla 2 con péptidos que contienen los péptidos restantes de la parte C-terminal de la glicoproteína del filovirus específica. Los péptidos superpuestos diseñados coincidieron completamente con la glicoproteína codificada por los vectores rAd. Se calcularon los números de unidades formadoras de puntos (SFU) por  $10^6$  células.

Para la determinación de títulos de anticuerpos específicos de GP, se utilizó un ELISA de anticuerpo de ratón específico de glicoproteína SEBOV o MARV. Las placas ELISA Maxisorp (Nunc) se recubrieron durante la noche (ON)

a 4 °C con 10 µg/ml de L-PBS, lectina en PBS (pH 7,4 Gibco). Las placas se bloquearon posteriormente durante dos horas a temperatura ambiente (RT) utilizando un *buffer* de bloqueo y se recubrieron con SEBOV y MARV diluidos donde contiene sobrenadante HEK293. Después de lavar con el *buffer* de lavado, el suero estándar de referencia diluido y el suero de prueba se agregaron (por duplicado) a las placas con *buffer* de muestra y se incubaron a RT durante una hora. Como control negativo se toma suero de ratón sin tratamiento previo. Las placas se lavaron nuevamente con *buffer* de lavado, se recubrieron con IgG-HRP anti-ratón diluido en *buffer* de muestra, se incubaron a RT durante 1 hora y se revelaron utilizando una solución OPD (Sigma) según las recomendaciones del fabricante. Después de detener la reacción enzimática con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M, se midió la OD a 492 nm utilizando un lector de placas ELISA. Todos los análisis se realizaron utilizando el software Gen5. Las concentraciones séricas en una muestra de prueba se informaron en unidades ELISA por mililitro (EU/ml) con los siguientes criterios de inclusión y exclusión; se excluyó la variación de la OD entre los duplicados en cada muestra > 20 % de la muestra, la OD promedio del suero sin tratamiento previo debería ser inferior a 0,5 y, finalmente, por muestra de suero, al menos dos diluciones deberían estar por encima de la OD 0,5 para obtener el valor correcto de EU/ml.

La figura 3E muestra la respuesta inmune celular inducida por rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV en comparación con el control de referencia, la mezcla de los respectivos vectores monovalentes. Aunque el ELISPOT detectó una respuesta inmune celular contra MARV 8 semanas después de la inmunización, no se detectó respuesta inmune celular en el ELISPOT de SEBOV. La figura 3F muestra la respuesta inmune humoral medida por ELISA. La respuesta inmune humoral inducida por rAd35.E1.MARV-F2A-SEBOV se redujo en comparación con la inducida por la mezcla de rAd35.MARV y rAd35.SEBOV.

A partir de los experimentos presentados en la figura 3, es evidente que se pueden producir vectores rAd35 que albergan un transgén MARV-F2A-SEBOV bivalente y pueden ser genéticamente estables hasta el pasaje 10, pero se observaron algunas bandas de supresión en números de pasaje más altos (p13) para uno de los constructos. Además, la expresión transgénica y la inmunogenicidad inducidas por el rAd35.MARV-F2A-SEBOV bivalente se redujeron significativamente en comparación con la mezcla de los vectores monovalentes rAd35.MARV y rAd35.SEBOV. Por lo tanto, se determinó que la estrategia E1-F2A para la bivalencia es inferior a la mezcla de los vectores monovalentes y no es óptima para usar en terapia génica o aplicaciones de vacunas.

#### **Ejemplo [Comparativo] 4: Preparación y caracterización de los vectores bivalentes de rAd35 con dos casetes de expresión en una configuración de cabeza a cola en E1**

Como tercera estrategia para generar vectores rAd bivalentes, se analizó si se podían insertar dos casetes de expresión en una configuración de cabeza a cola en la región E1. Una representación esquemática del diseño se muestra en la figura 4A. Dos genes se clonan en la región E1 dirigidos por los promotores heterólogos mCAG (gen 1) y hCMV (gen 2). Se generaron diferentes vectores, a saber, rAd35.mCAG.Luc-hCMV.eGFP y rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV, y se analizó la estabilidad genética del casete de expresión por propagación en PER.C6@ hasta el pasaje 13. Se analizaron cinco placas para cada vector. Se halló que una placa de rAd35.mCAG.Luc-hCMV.eGFP era inestable como lo indica la banda de PCR en la figura 4B (calle 2). En contraste, el rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV no mostró tales bandas de supresión en ninguna de las placas analizadas.

La expresión de transgén del rAd con la configuración del transgén de cabeza a cola en E1 dirigida por los promotores heterólogos se analizó mediante transferencia Western y la expresión se comparó con los vectores de inserto único de referencia descritos anteriormente como se indica en la figura 4C. Las células A549 se transdujeron con 1000, 2500 y 5000 (VP/célula) y la producción de transgén se analizó mediante transferencia Western usando anticuerpos primarios específicos de antígeno. Hubo niveles comparables de expresión del transgén MARV de la rAd bivalente en comparación con los vectores monovalentes de referencia, pero se observaron niveles ligeramente reducidos de la expresión de SEBOV.

Como control adicional del procesamiento y presentación correctos de los transgenes de la glicoproteína, se realizó la tinción de la superficie mediante FACS (% de células positivas) de las células A549 transducidas por el vector rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV (111, 333 y 1000 VP/célula) con los respectivos anticuerpos antigénicos específicos. La comparación directa con los controles de referencia de inserto único, rAd35.SEBOV y rAd35.MARV, muestra niveles más altos de MARV asociado a la superficie y los niveles más bajos de SEBOV asociados a la superficie se produjeron con el vector rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV (figura 4D).

rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV se analizó adicionalmente para determinar la inmunogenicidad en ratones. Se inmunizaron 10 ratones por grupo por vía intramuscular con una dosis única (1x10<sup>9</sup>) del vector de vacuna purificada y se compararon directamente con una mezcla de los dos vectores monovalentes rAd35.MARV y rAd35.SEBOV. Las respuestas inmunes humorales y celulares se analizaron mediante ELISPOT y ELISA 8 semanas después de la inmunización (figura 4E-F). Los títulos de anticuerpos de MARV detectados fueron mayores para los ratones inmunizados con rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV que en los animales de control. Por el contrario, los niveles de anticuerpos específicos de SEBOV se redujeron en ratones inmunizados con rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV en comparación con los animales de control. Además, las respuestas de células T contra a los antígenos tanto MARV como SEBOV inducidas por rAd35.mCAG.MARV-hCMV.SEBOV se redujeron en comparación con los animales de control inmunizados con la mezcla de los respectivos vectores monovalentes. Por lo tanto, se determinó que la

configuración bivalente de cabeza a cola en E1 dirigida por los promotores heterólogos es inferior a la mezcla de los vectores monovalentes, y esta configuración bivalente de cabeza a cola por lo tanto no es óptima para uso en terapia génica o aplicaciones de vacunas.

### 5 **Ejemplo 5: Preparación y caracterización de vectores adenovirales que albergan un promotor bidireccional de ratón CMV IE1/IE2.**

Finalmente, la cuarta opción para generar rAd multivalente se diseñó donde se pueden insertar dos genes de elección en la región E1. En contraste con los diseños discutidos anteriormente, los antígenos son dirigidos por un promotor bidireccional ( $P_{bidir}$  o bidir) y se colocan en una orientación invertida en el lado 5' del promotor y en la orientación derecha en el lado 3'. Debido a que el objetivo era encontrar un promotor bidireccional que exprese niveles similares de ambos transgenes codificados, lo que se indica aquí como una expresión de transgén equilibrada, se analizaron varios diseños de promotores bidireccionales diferentes para determinar la potencia y el equilibrio de la expresión de transgén (figura 5). Los primeros tres promotores bidireccionales diferentes denominados bidir1-3 se analizaron para determinar la potencia y el equilibrio mediante la transfección transitoria de los plásmidos pAdapt35 en células HEK293 y el análisis de los niveles de expresión de luciferasa (Luc) y eGFP. Los diseños de P bidir1, P bidir2 y P bidir3 no estaban relacionados y se generaron para identificar un potente promotor bidireccional. Si bien P bidir 3 se basa en el promotor CMV de ratón bidireccional natural, P bidir 1 y P bidir 2 son diseños de promotores bidireccionales sintéticos que utilizan promotores ubicuos fuertes como se conoce en la técnica en una configuración de cabeza a cabeza con solo una secuencia potenciadora presente (Amendola y col., Nature Biotechnology 2005). Los genes indicadores eGFP y Luc se colocaron en el lado 5' o 3' del promotor (como se muestra en la figura 5A) y se compararon por la expresión del gen indicador respectivo. La intensidad de fluorescencia media relativa de eGFP (MFI) y las unidades de luz relativa de luciferasa (RLU) registradas para cada combinación de genes promotores e indicadores se midieron en células HEK293 (transfección transitoria) y células A549 (infección por virus). La actividad de la luciferasa se midió en lisados celulares en presencia de DTT 0,1 % (1 M), en el luminómetro de microplaca Luminoskan™ Ascent. La fluorescencia de eGFP se midió en el citómetro de flujo (FACS) mediante tripsinización, centrifugación y resuspensión de los sedimentos celulares en PBS/FBS 1 % (material no viral) o en CellFix (material viral).

La expresión del gen indicador transitorio en las células HEK293, ilustra que el promotor bidir3 es el promotor más potente y equilibrado. Cuando se comparó directamente con los promotores bidir1 y bidir2, se encontró la expresión más equilibrada de Luc y eGFP para el promotor bidir3. Con respecto a la potencia, los promotores tanto bidir1 como bidir2 fueron superados por los niveles de expresión de los genes indicadores registrados para el promotor bidir3 (figura 5B).

Para confirmar los resultados obtenidos con las transfecciones transitorias en células HEK293, se generaron vectores adenovirales rAd35.eGFP-bidir3-Luc y rAd35.Luc-bidir3-eGFP y se analizó la expresión de los genes indicadores en células A549 infectadas con 1000 VP/célula. (figura 5C). La comparación de la expresión de eGFP del indicador directo y luciferasa de luciérnaga entre los vectores de inserto doble bidir3 con los controles de inserto único respectivos, muestra niveles comparables de eGFP independientemente de la posición con respecto al promotor. Por otro lado, la expresión de luciferasa es mayor cuando el gen de luciferasa se ubica en el lado 3' en comparación con el lado 5' del promotor. Sin embargo, los niveles de expresión del gen indicador registrados para los vectores de inserto doble bidir3 superan los niveles registrados para los controles de vector de inserto único, lo que indica que bidir3 es el promotor más potente (figura 5C).

Por lo tanto, se determinó que un rAd con un promotor de CMV de ratón bidireccional es superior al rAd bivalente informado previamente con respecto a los niveles de expresión de los dos transgenes, eGFP y Luc. Además, la expresión de los dos transgenes de rAd con un promotor bidireccional bidir3 también fue mejor que los vectores monovalentes de referencia que se analizaron. Por lo tanto, se determinó que el rAd con un promotor bidireccional bidir3 puede ser adecuado para usar en la terapia génica o aplicaciones de vacunas con respecto a los niveles de expresión de los transgenes.

En la figura 6 se muestra un diseño representativo de un promotor mCMV IE1/IE2 con la secuencia y las anotaciones correspondientes indicadas con flechas apiladas. La secuencia principal de mCMV IE1/IE2 contiene dos secuencias potenciadoras MIE1 y MIE2 que dirigen la expresión en ambas direcciones. Además, la secuencia contiene dos cajas TATA y dos sitios de inicio de la transcripción (TSS), ambos flanqueados por las respectivas secuencias de intrones ApoE1 humana y quiméricas (véanse figuras 5D y 6). Se proporciona una secuencia representativa para una secuencia promotora bidireccional de mCMV que incluye intrones (bidir3) como SEQ ID NO:1 y se proporciona una secuencia representativa para una secuencia promotora bidireccional de mCMV que excluye intrones como SEQ ID NO:2.

### 60 **Ejemplo 6: Preparación y caracterización de los vectores bivalentes de rAd35 con un casete de expresión bidireccional mCMV**

Un promotor bidireccional mCMV seleccionado se representa esquemáticamente en la figura 7A, que representa la orientación de los genes insertados y la posición en el genoma del vector rAd35. Se analizaron diferentes vectores rAd35 para determinar la estabilidad genética hasta p 13 en células PER.C6®, niveles de expresión de antígenos

(expresión total y de superficie) e inmunogenicidad en ratones (figura 7).

Los diferentes vectores rAd también se evaluaron para determinar la capacidad de rescate en células PER.C6® y la estabilidad genética en p13. Los datos se resumen en la tabla 2. La estabilidad genética se evaluó para cada vector mediante el pasaje de las cinco placas en PER.C6® hasta p13. Se encontró que todos los vectores son genéticamente estables en p13, sin bandas de supresión (figura 7B). Los datos en la figura 7B son un conjunto representativo para tres vectores, rAd35.eGFP-mCMV-Luc, rAd35.Luc-mCMV-eGFP y rAd35.MARV-mCMV-SEBOV donde se aisló el ADN viral en el pasaje 13 (p13) y la PCR se realizó usando cebadores que flanquean el casete de expresión E1.

Posteriormente, los niveles de expresión de rAd35.MARV-mCMV-SEBOV se evaluaron tanto para la expresión total (transferencia Western, figura 7C) como para la expresión en superficie (FACS, figura 7D) usando anticuerpos anti-MARV y anti-SEBOV. Para evaluar los niveles de expresión totales de SEBOV y MARV, A549 se infectaron con 1000, 2500 y 5000 VP/célula y se compararon directamente con los vectores de inserto único rAd35.E1.MARV o rAd35.SEBOV. No se observó una diferencia obvia en los niveles de proteína total de MARV entre rAd35.MARV-mCMV-SEBOV y rAd35.E1.MARV. Por el contrario, los niveles de proteína detectados para SEBOV expresados a partir de rAd35.MARV-mCMV-SEBOV superaron el control de inserto único rAd35.E1.SEBOV (figura 7C). La expresión de antígeno MARV y SEBOV en la superficie celular se analizó mediante la infección de las células A549 con 111, 333 y 1000 VP/célula rAd35.MARV-mCMV-SEBOV o una mezcla de rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV y se analizaron las células positivas MARV o SEBOV (%) en FACS 48 horas después de la infección (48 hpi). En comparación con la mezcla de control de vectores monovalentes, tanto la tinción anti-MARV como la tinción anti-SEBOV en FACS mostraron porcentajes más altos de células positivas con rAd35.MARV-mCMV-SEBOV (figura 7D).

A continuación, se comparó directamente la inmunogenicidad de rAd35.MARV-mCMV-SEBOV ( $2 \times 10^9$  VP) con una mezcla de los respectivos controles de inserto único, rAd35.E1.MARV + rAd35.E1.SEBOV ( $2 \times 10^9$  VP), mediante la observación de las respuestas de células T específicas de MARV y SEBOV y respuestas de células B (figura 7E y F, respectivamente). Los resultados de ELISPOT en la figura 7E representan las fracciones de células T positivas para MARV y SEBOV en unidades formadoras de manchas por  $10^6$  (SFU/ $10^6$ ) en esplenocitos de ratones, ocho semanas después de la inmunización. La respuesta de las células T inducidas por SEBOV fue mayor en el grupo de ratones inmunizados con rAd35.MARV-mCMV-SEBOV que con la mezcla de vectores de inserto único, rAd35.MARV + rAd35.SEBOV (figura 7E). La respuesta de células T inducida por MARV en el grupo de ratones inmunizados con el inserto doble rAd35.MARV-mCMV-SEBOV no fue inferior a la mezcla rAd35.MARV + rAd35.SEBOV (figura 7E). Las correspondientes respuestas de células B específicas de SEBOV y MARV se midieron en ELISA y se expresaron como unidades de ELISA por ml (EU/ml). Las respuestas de células B específicas tanto de MARV como de SEBOV fueron mayores en el grupo de ratones inmunizados con el inserto doble rAd35.MARV-mCMV-SEBOV en comparación con la mezcla del inserto único de rAd35.MARV + rAd35.SEBOV (figura 7F).

Por lo tanto, según los resultados presentados anteriormente para rAd35.MARV-mCMV-SEBOV, se determinó que un rAd35 con un promotor de CMV de ratón bidireccional que expresa MARV y SEBOV es superior al rAd bivalente informado previamente con respecto a la estabilidad genética, niveles de expresión de los dos transgenes, e inmunogenicidad. Además, se determinó que rAd35 con un promotor de CMV de ratón bidireccional proporciona niveles de expresión suficientes de ambos transgenes para generar respuestas inmunes significativas de células T y células B a ambos antígenos. Por lo tanto, se determinó que el rAd35 con un promotor de CMV de ratón bidireccional puede ser adecuado para usar en terapia génica y aplicaciones de vacunas con respecto a la estabilidad genética, niveles de expresión de los transgenes e inmunogenicidad de los antígenos expresados.

#### **Ejemplo 7: Preparación y caracterización de vectores bivalentes rAd26 usando un casete de expresión bidireccional mCMV**

El casete de expresión del promotor bidireccional bivalente que contiene los antígenos MARV y SEBOV (MARV.mCMV.SEBOV) se analizó exhaustivamente en rAd26 para determinar la estabilidad genética, los niveles de expresión de los dos antígenos (total y superficial) y la inmunogenicidad en ratones contra los antígenos codificados. El diseño general de rAd26 sigue el diseño de rAd35 donde el casete de expresión se ubica en la región E1 y cada antígeno es controlado por el promotor mCMV bidireccional colocado centralmente (figura 8A). Para las pruebas de estabilidad genética, rAd26.MARV.mCMV.SEBOV se pasaron hasta 13 pasajes (p13) en PER.C6®. El ADN viral se aisló en p13 y se analizó mediante PCR para detectar posibles supresiones en E1 mediante el uso de cebadores que flanquean el casete de expresión del transgén bidireccional (figura 8B). No se detectaron bandas de supresión en las placas analizadas, lo que indica un buen perfil de estabilidad genética de rAd26.MARV.mCMV.SEBOV. Además, los productos de la PCR de las placas p13 se secuenciaron y la secuenciación confirmó la ausencia de mutaciones y los codones de detención. Por lo tanto, según el análisis de PCR y la secuenciación, rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV es genéticamente estable.

Los niveles de expresión de proteínas totales de los antígenos MARV y SEBOV codificados en rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV se evaluaron mediante la infección de las células A549 con 10000, 25000 y 50000 VP/célula, se lisaron las células 48 hpi y tificaron con anticuerpos anti-MARV o anti-SEBOV en una transferencia Western (figura 8C). La expresión de la proteína del vector de inserto doble se comparó directamente con los vectores de inserto único, rAd26.E1.SEBOV y rAd26.E1.MARV. La tinción con anti-MARV mostró una expresión reducida de

MARV en las células infectadas con el vector de inserto doble rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV cuando se comparó con el rAd26.E1.MARV. Por otro lado, se detectaron cantidades aumentadas de SEBOV en las células infectadas con rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV cuando se compararon con el control de inserto único rAd26.E1.MARV (figura 8C).

5 La expresión en la superficie de los antígenos MARV y SEBOV se evaluó mediante la infección de las células A549 con 100000, 20000, 4000 y 800 VP/célula, tinción con anti-MARV o anti-SEBOV 48 horas después de la infección (48 hpi) y análisis del porcentaje de MARV o SEBOV (%) de células positivas por FACS (figura 4D). La diferencia en la expresión de MARV observada en lisados A549 no se detectó en el análisis FACS de células A549 infectadas con rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV. Aquí, a diferencia de lo que se halló con la transferencia Western para la expresión  
10 total de proteínas, se detectaron cantidades iguales de MARV en la superficie de las células infectadas con el rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV y rAd26.E1.MARV (figura 8D). Además, no se observaron diferencias entre las cantidades de SEBOV expresadas en la superficie en células infectadas con rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV y rAd26.E1.SEBOV. El resultado de FACS para la expresión de SEBOV en la superficie celular fue compatible con la tinción total de proteínas en la transferencia Western (figuras 8C y D).

15 La potencia inmunogénica de rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV se evaluó mediante la comparación de la capacidad del vector bivalente y una mezcla de los vectores de inserto único para inducir las respuestas de las células T y B específicas de MARV y SEBOV con los ensayos ELISPOT y ELISA, respectivamente. Para ambos ensayos, se inmunizaron 12 ratones por grupo por vía intramuscular (IM) con  $1 \times 10^9$  VP de rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV o con una mezcla de  $1 \times 10^9$  VP rAd26.E1.MARV y  $1 \times 10^9$  VP rAd26.E1.SEBOV. Para explicar el posible efecto adyuvante del grupo que recibe el total de  $2 \times 10^9$  VP de la combinación de inserto único, se coinyectó el vector  $1 \times 10^9$  VP rAd26.vacío con el rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV. Como control negativo, dos grupos de cinco ratones recibieron un total de  $2 \times 10^9$  VP rAd26.vacío. Antes de la vacunación, los ratones también se sangraron para generar suero de control sin tratamiento previo (datos no mostrados). Los resultados de los ensayos ELISPOT y ELISA se muestran en las figuras  
20 8E y F, respectivamente.

25 Las respuestas de células T específicas de MARV y SEBOV, medidas en ELISPOT en unidades formadoras de puntos/ $10^6$  esplenocitos (SFU/ $10^6$ ) mostraron algunas diferencias entre el vector de inserto doble y la mezcla de los vectores de inserto único, pero las diferencias solo fueron significativas a las dosis más bajas de  $2 \times 10^9$  VP. En el grupo de ratones inmunizados con la dosis más baja de la mezcla,  $2 \times 10^9$  VP rAd26.E1.SEBOV + rAd26.E1.MAR, hubo respuestas significativamente más altas de células T específicas ( $p < 0,01$ ) de MARV y ( $p < 0,05$ ) de SEBOV en comparación con la misma dosis de rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV. Estas diferencias, sin embargo, no se observaron para las respuestas de células T específicas de MARV o SEBOV en ratones inmunizados con la dosis de VP más alta de  $2 \times 10^{10}$  VP de los vectores. Además, el vector de inserto doble proporcionó respuestas potentes de  
30 células T para ambos antígenos (figura 8E).

35 Sobre la base de los datos de ELISA, también hubo algunas diferencias en la respuesta de las células B para el vector de inserto doble en comparación con la mezcla de los vectores de inserto único, pero las diferencias solo se observaron con MARV. Para SEBOV, no hubo diferencias significativas en los niveles de anticuerpos SEBOV en ratones inmunizados con ninguna de las dosis de los diferentes vectores (figura 8F). Para las respuestas de células B específicas de MARV, hubo niveles significativamente más altos ( $p < 0,01$ ) de IgG (unidades ELISA por ml (EU/ml)) para los ratones inmunizados con cualquier dosis de la mezcla que contiene los rAd26.E1.SEBOV + rAd26.E1.MARV de insertos únicos en comparación con las mismas dosis para rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV de inserto doble (figura 8F). Aquí nuevamente, sin embargo, el ELISA mostró que el vector de inserto doble proporcionó respuestas potentes  
40 de células B.

45 Por lo tanto, según los datos del análisis FACS para la expresión en superficie de los transgenes y los ensayos ELISPOT y ELISA para medir la inmunogenicidad, se determinó que el vector de doble inserto rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV proporciona una expresión potente y respuestas de células T y células B potentes contra los antígenos MARV y SEBOV. Se detectaron algunas diferencias para los antígenos con el vector de inserto doble en comparación con la mezcla de los vectores de inserto único, pero rAd26.E1.MARV.mCMV.SEBOV proporcionó altos niveles de expresión en la superficie de los dos transgenes e indujo respuestas de células T y células B potentes. Además, sobre la base del análisis de PCR y la secuenciación, rAd26.E1.MARV-mCMV-SEBOV era genéticamente estable. Por lo tanto, se determinó que al igual que rAd35 con un promotor de CMV de ratón bidireccional, rAd26 con un promotor de CMV de ratón bidireccional puede ser adecuado para usar en terapia génica y aplicaciones de vacunas con respecto a la estabilidad genética, expresión de transgenes e inmunogenicidad de los antígenos expresados.

## 60 Conclusión

65 Como se describió anteriormente, una gran cantidad de vectores promotores bidireccionales mCMV, rAd35 y rAd26 que contienen diferentes glicoproteínas de Filovirus, así como genes indicadores (eGFP y Luciferasa), se analizaron para determinar la estabilidad genética en células PER.C6®, expresión de proteína transgénica (total y superficial), e inmunogenicidad de los antígenos con respecto a las respuestas tanto de células T como de células B. Considerando el número de vectores analizados, con cinco o más placas analizadas para cada vector, y la sensibilidad del análisis de PCR del casete de expresión E1 para la estabilidad genética, se determinó que el rAd de la presente invención con

un promotor de mCMV bidireccional es genéticamente estable sin bandas de supresión en p13. Además, sobre la base del análisis FACS de la expresión transgénica y el análisis ELISPOT y ELISA de la inmunogenicidad de los antígenos expresados con respecto a las respuestas de las células T y células B, se determinó que el rAd de la presente invención con un promotor bidireccional es adecuado para usar en terapia génica y aplicaciones de vacunas. Por lo tanto, el rAd de la presente invención con un promotor bidireccional mCMV proporciona una mejora significativa en comparación con los vectores rAd bivalentes descritos previamente en la técnica.

5

**Tabla 1:**

Intento de rescate, resultado de rescate y estabilidad del genoma para los vectores rAd35 y rAd26 utilizando el diseño E1-E3 descrito en la figura 2A. Los resultados indican que los rAd bivalentes con un antígeno codificado en E1 y uno en E3 son genéticamente inestables y difíciles de expandir.			
Vector y Transgenes	Intento de rescate	Resultado del rescate	Estabilidad del genoma
<b>rAd35</b>			
E1.EBOV-E3.SEBOV	1	exitoso	inestable
E1.SEBOV-E3.EBOV	1	exitoso	inestable
E1.MARV-E3.EBOV	1	exitoso	inestable
E1.MARV-E3.SEBOV	1	exitoso	inestable
E1.eGFP-E3.EBOV	1	exitoso	inestable
E1.eGFP-E3.SEBOV	1	exitoso	inestable
<b>rAd26</b>			
E1.EBOV-E3.SEBOV	2	difícil de expandir	inestable
E1.eGFP-E3.SEBOV	2	difícil de expandir	inestable

10

**Tabla 2:**

Intento de rescate, resultado de rescate, y estabilidad del genoma para vectores rAd que albergan un casete de expresión bidireccional mCMV con diferentes transgenes.			
Vector y Transgenes	Intento de rescate	Resultado del rescate	Estabilidad del genoma
<b>rAd35</b>			
Luc-mCMV-eGFP	1	exitoso	estable
eGFP-mCMV-Luc	1	exitoso	estable
MARV-mCMV-SEBOV	1	exitoso	estable
SEBOV-mCMV-MARV	1	exitoso	estable
MARV-mCMV-CIEBOV	1	exitoso	estable
CIEBOV-mCMV-MARV	1	exitoso	estable
EBOV-mCMV-SEBOV	1	exitoso	estable
SEBOV-mCMV-EBOV	1	exitoso	estable

(continuación)

<b>rAd26</b>			
Luc-mCMV-eGFP	1	exitoso	estable
MARV-mCMV-SEBOV	1	exitoso	estable
EBOV-mCMV-SEBOV	1	exitoso	estable
SEBOV-mCMV-EBOV	1	no exitoso	-
MARV-mCMV-CIEBOV	1	exitoso	estable
CIEBOV-mCMV-MARV	1	exitoso	estable

**REFERENCIAS****5 Documentos de patente de EE. UU.**

- US5057540A (10/15/1991). «Saponin adjuvant». Kensil, Charlotte A.; Marciani, Dante J.  
 US5122458A (6/16/1992). «Use of a bGH gDNA polyadenylation signal in expression of non-bGH polypeptides in higher eukaryotic cells». Post, Leonard E.; Palermo, Daniel P.; Thomsen, Darrell R.; Rottman, Fritz M.; Goodwin, Edward C.; Woychik, Richard P.  
 10 US5559099A (9/24/1996). «Penton base protein and methods of using same». Wickham, Thomas J.; Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.; McVey, Duncan L.; Brader, Joseph T.  
 US5837511A (11/17/1998). «Non-group C adenoviral vectors». Falck Pedersen, Erik S.; Crystal, Ronald G.; Mastrangeli, Andrea; Abrahamson, Karil  
 15 US5837520A (11/17/1998). «Method of purification of viral vectors». Shabram, Paul W.; Huyghe, Bernard G.; Liu, Xiaodong; Shepard, H. Michael  
 US5846782A (12/8/1998). «Targeting adenovirus with use of constrained peptide motifs». Wickham, Thomas J.; Roelvink, Petrus W.; Kovesdi, Imre  
 US5851806A (12/22/1998). «Complementary adenoviral systems and cell lines». Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.;  
 20 McVey, Duncan L.; Bruder, Joseph T.; Lizonova, Alena  
 US5891690A (4/6/1999). «Adenovirus E1-complementing cell lines». Massie, Bernard  
 US5965541A (10/12/1999). «Vectors and methods for gene transfer to cells». Wickham, Thomas J.; Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.  
 US5981225A (11/9/1999). «Gene transfer vector, recombinant adenovirus particles containing the same, method for  
 25 producing the same and method of use of the same». Kochanek, Stefan; Schiedner, Gudrun  
 US5994106A (11/30/1999). «Stocks of recombinant, replication-deficient adenovirus free of replication-competent adenovirus». Kovesdi, Imre; Brough, Douglas E.; McVey, Duncan L.; Bruder, Joseph T.; Lizonova, Alena  
 US5994128A (11/30/1999). «Packaging systems for human recombinant adenovirus to be used in gene therapy». Fallaux, Frits Jacobus; Hoeben, Robert Cornelis; Van der Eb, Alex Jan; Bout, Abraham; Valerio, Domenico  
 30 US6020191A (2/1/2000). «Adenoviral vectors capable of facilitating increased persistence of transgene expression». Scaria, Abraham; Gregory, Richard J.; Wadsworth, Samuel C.  
 US6040174A (3/21/2000). «Defective adenoviruses and corresponding complementation lines». Imler, Jean Luc; Mehtali, Majid; Pavirani, Andrea  
 US6083716A (7/4/2000). «Chimpanzee adenovirus vectors». Wilson, James M.; Farina, Steven F.; Fisher, Krishna  
 35 J.  
 US6113913A (9/5/2000). «Recombinant adenovirus». Brough, Douglas E.; Kovesdi, Imre  
 US6225289B1 (5/1/2001). «Methods and compositions for preserving adenoviral vectors». Kovesdi, Imre; Ransom, Stephen C.  
 US6261823B1 (7/17/2001). «Methods for purifying viruses». Tang, John Chu Tay; Vellekamp, Gary; Bondoc, Jr.,  
 40 Laureano L.  
 US6485958B2 (11/26/2002). «Method for producing recombinant adenovirus». Blanche, Francis; Guillaume, Jean Marc  
 US7326555B2 (2/5/2008). «Methods of adenovirus purification». Konz, Jr., John O.; Lee, Ann L.; To, Chi Shung  
 Brian; Goerke, Aaron R  
 45 US8932607B2 (1/13/2015). «Batches of recombinant adenovirus with altered terminal ends». Custers, Jerome H. H. V.; Vellinga, Jort

**Documentos de patente europea:**

- 50 EP1230354B1 (1/7/2004). «PERMANENT AMNIOCYTE CELL LINE, THE PRODUCTION THEREOF AND ITS USE FOR PRODUCING GENE TRANSFER VECTORS». KOCHANNEK, Stefan; SCHIEDNER, Gudrun  
 EP1601776B1 (7/2/2008). «EXPRESSION VECTORS COMPRISING THE MCMV IE2 PROMOTER». CHATELLARD, Philippe; IMHOF, Markus  
 EP853660B1 (1/22/2003). «METHOD FOR PRESERVING INFECTIOUS RECOMBINANT VIRUSES, AQUEOUS  
 55 VIRAL SUSPENSION AND USE AS MEDICINE». SENE, Claude

**Documentos de patente internacional:**

- 5 WO2003049763A1 (6/19/2003). «COMPOSITION FOR THE PRESERVATION OF VIRUSES | COMPOSITION POUR LA CONSERVATION DE VIRUS». SETIAWAN, Kerrie; CAMERON, Fiona, Helen  
 WO2003061708A1 (7/31/2003). «STABILIZED FORMULATIONS OF ADENOVIRUS». PUNGOR, Erno  
 WO2003078592A2 (9/25/2003). «METHOD FOR THE PURIFICATION, PRODUCTION AND FORMULATION OF ONCOLYTIC ADENOVIRUSES». MEMARZADEH, Bahram; PENNATHUR-DAS, Rukmini; WYPYCH, Joseph; YU, De Chao
- 10 WO2003104467A1 (12/18/2003). «MEANS AND METHODS FOR THE PRODUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS». VOGELS, Ronald; BOUT, Abraham  
 WO2004001032A2 (12/31/2003). «STABLE ADENOVIRAL VECTORS AND METHODS FOR PROPAGATION THEREOF». VOGELS, Ronald; HAVENGA, Menzo, Jans, Emco; ZUIJGEEEST, David, Adrianus, Theodorus  
 WO2004004762A1 (1/15/2004). «ISCOM PREPARATION AND USE THEREOF». MOREIN, Bror; LOVGREN
- 15 BENGTTSSON, Karin  
 WO2004020971A2 (3/11/2004). «CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR ADENOVIRUS PURIFICATION». SENESAC, Joseph  
 WO2004037294A2 (5/6/2004). «NEW SETTINGS FOR RECOMBINANT ADENOVIRAL-BASED VACCINES». HAVENGA, Menzo, Jans, Emco; HOLTERTMAN, Lennart; KOSTENSE, Stefan; PAU, Maria, Grazia; SPRANGERS,
- 20 Mieke, Caroline; VOGELS, Ronald  
 WO2004055187A1 (7/1/2004). «RECOMBINANT VIRAL-BASED MALARIA VACCINES». PAU, Maria Grazia; HOLTERTMAN, Lennart; KASPERS, Jorn; STEGMANN, Antonius, Johannes, Hendrikus  
 WO2005002620A1 (1/13/2005). «QUIL A FRACTION WITH LOW TOXICITY AND USE THEREOF». MOREIN, Bror; LOVGREN BENGTTSSON, Karin; EKSTROM, Jill; RANLUND, Katarina
- 25 WO2005071093A2 (8/4/2005). «CHIMPANZEE ADENOVIRUS VACCINE CARRIERS». CIRILLO, Agostino; COLLOCA, Stefano; ERCOLE, Bruno, Bruni; MEOLA, Annalisa; NICOSIA, Alfredo; SPORENO, Elisabetta  
 WO2005080556A2 (9/1/2005). «VIRUS PURIFICATION METHODS». WEGGEMAN, Miranda; VAN CORVEN, Emile Joannes Josephus Maria  
 WO2006053871A2 (5/26/2006). «MULTIVALENT VACCINES COMPRISING RECOMBINANT VIRAL VECTORS».
- 30 HAVENGA, Menzo, Jans, Emco; VOGELS, Ronald; SADOFF, Jerald; HONE, David; SKEIKY, Yasir Abdul Wahid; RADOSEVIC, Katarina  
 WO2006108707A1 (10/19/2006). «VIRUS PURIFICATION USING ULTRAFILTRATION». WEGGEMAN, Miranda  
 WO2006120034A1 (11/16/2006). «VACCINE COMPOSITION». ERTL, Peter, Franz; TITE, John, Philip; VAN WELY, Catherine Ann
- 35 WO2007073513A2 (6/28/2007). «METHOD FOR PROPAGATING ADENOVIRAL VECTORS ENCODING INHIBITORY GENE PRODUCTS». GALL, Jason, G., D.; BROUGH, Douglas, E.; RICHTER, King, C.  
 WO2007100908A2 (9/7/2007). «CHIMERIC ADENOVIRAL VECTORS». TUCKER, Sean, N.  
 WO2007104792A2 (9/20/2007). «RECOMBINANT ADENOVIRUSES BASED ON SEROTYPE 26 AND 48, AND USE THEREOF». BAROUCH, Dan H.; HAVENGA, Menzo Jans Emko
- 40 WO2007110409A1 (10/4/2007). «COMPOSITIONS COMPRISING A RECOMBINANT ADENOVIRUS AND AN ADJUVANT». HAVENGA, Menzo Jans Emko; RADOSEVIC, Katarina  
 WO2009026183A1 (2/26/2009). «USE OF CHIMERIC HIV/SIV GAG PROTEINS TO OPTIMIZE VACCINE-INDUCED T CELL RESPONSES AGAINST HIV GAG». NABEL, Gary, J.; YANG, Zhi-Yong; SHI, Wei; BAROUCH, Dan, H.
- 45 WO2009117134A2 (9/24/2009). «AEROSOLIZED GENETIC VACCINES AND METHODS OF USE». ROEDERER, Mario; RAO, Srinivas; NABEL, Gary, J.; ANDREWS, Charla, Anne  
 WO2010085984A1 (8/5/2010). «SIMIAN ADENOVIRUS NUCLEIC ACID- AND AMINO ACID-SEQUENCES, VECTORS CONTAINING SAME, AND USES THEREOF». COLLOCA, Stefano; NICOSIA, Alfredo; CORTESE, Riccardo; AMMENDOLA, Virginia; AMBROSIO, Maria
- 50 WO2010086189A2 (8/5/2010). «SIMIAN ADENOVIRUS NUCLEIC ACID- AND AMINO ACID-SEQUENCES, VECTORS CONTAINING SAME, AND USES THEREOF». COLLOCA, Stefano; NICOSIA, Alfredo; CORTESE, Riccardo; AMMENDOLA, Virginia; AMBROSIO, Maria  
 WO2010096561A1 (8/26/2010). «SYNTHETIC HIV/SIV GAG PROTEINS AND USES THEREOF». NABEL, Gary J.; YANG, Zhi-yong; SHI, Wei; BAROUCH, Dan H.
- 55 WO2011045378A1 (4/21/2011). «METHOD FOR THE PURIFICATION OF ADENOVIRUS PARTICLES». DE VOCHT, Marcel; VEENSTRA, Marloes  
 WO2011045381A1 (4/21/2011). «PROCESS FOR ADENOVIRUS PURIFICATION FROM HIGH CELL DENSITY CULTURES». DE VOCHT, Marcel, Leo; VEENSTRA, Marloes
- 60 WO2013139911A1 (9/26/2013). «VACCINE AGAINST RSV». RADOSEVIC, Katarina; CUSTERS, Jérôme H.H.V.; VELLINGA, Jort; WIDJOJOATMODJO, Myra N.  
 WO2013139916A1 (9/26/2013). «VACCINE AGAINST RSV». RADOSEVIC, Katarina; CUSTERS, Jérôme H.H.V.; VELLINGA, Jort; WIDJOJOATMODJO, Myra, N.

**Otras referencias:**

65

**Libros**

- Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995)
- Ausubel F.M., et al. (editors). *Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. (1987)
- 5 Freshney, R.I., *Culture of animal cells: A manual of basic technique*, fourth edition, Wiley-Liss Inc., ISBN 0-471-34889-9 (2000)
- Frokjaer S. and Hovgaard L. (editors), *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, Taylor & Francis (2000)
- Gennaro, A.R. (editor), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th edition, Mack Publishing Company (1990)
- 10 Horowitz, M.S., *Adenoviruses*, Chapter 68, in *Virology*, (B. N. Fields et al. (editors), 3rd Ed., Raven Press, Ltd., New York (1996)
- Kibbe A. (editor), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3rd edition, Pharmaceutical Press (2000)
- Kruse and Paterson (editors), *Tissue Culture*, Academic Press. (1973)
- MacPherson M.J., Hams B.D., Taylor G.R. (editors), *PCR2: A Practical Approach* (1995)
- 15 Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)
- Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989)
- Shenk, Thomas, *Adenoviridae and their Replication*, Chapter 67, in *Virology*, B. N. Fields et al. (editors), 3rd Ed., Raven Press, Ltd., New York (1996)
- 20 Watson et al., *Recombinant DNA*, 2nd ed., Scientific American Books. (1992)

### Revistas

- 25 Abbink, P., Lemckert, A. A., Ewald, B. A., Lynch, D. M., Denholtz, M., Smits, S., ... Barouch, D. H. (2007). Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*, 81(9), 4654-4663. doi: 10.1128/JVI.02696-06
- Abrahamsen, K., Kong, H. L., Mastrangeli, A., Brough, D., Lizonova, A., Crystal, R. G., & Falck-Pedersen, E. (1997). Construction of an adenovirus type 7a E1A- vector. *J Virol*, 77(11), 8946-8951.
- 30 Amendola, M., Venneri, M. A., Biffi, A., Vigna, E., & Naldini, L. (2005). Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat Biotechnol*, 23(1), 108-116.
- Bangari, D. S., & Mittal, S. K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine*, 24(7), 849-862. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.08.101
- Belousova, N., Harris, R., Zinn, K., Rhodes-Selser, M. A., Kotov, A., Kotova, O., ... Alvarez, R. D. (2006). Circumventing recombination events encountered with production of a clinical-grade adenoviral vector with a double-expression cassette. *Mol Pharmacol*, 70(5), 1488-1493.
- 35 Brough, D. E., Lizonova, A., Hsu, C., Kulesa, V. A., & Kovesdi, I. (1996). A gene transfer vector-cell line system for complete functional complementation of adenovirus early regions E1 and E4. *J Virol*, 70(9), 6497-6501.
- Cohen, C. J., Xiang, Z. Q., Gao, G. P., Ertl, H. C., Wilson, J. M., & Bergelson, J. M. (2002). Chimpanzee adenovirus CV-68 adapted as a gene delivery vector interacts with the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Gen Virol*, 83(Pt 1), 151-155.
- 40 de Felipe, P., Luke, G. A., Brown, J. D., & Ryan, M. D. (2010). Inhibition of 2A-mediated 'cleavage' of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences. *Biotechnol J*, 5(2), 213-223. doi: 10.1002/biot.200900134
- Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D., & Ryan, M. D. (2001). The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol*, 82(Pt 5), 1027-1041.
- 45 Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., ... Hoeben, R. C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 9(13), 1909-1917.
- Farina, S. F., Gao, G. P., Xiang, Z. Q., Rux, J. J., Burnett, R. M., Alvira, M. R., ... Wilson, J. M. (2001). Replication-defective vector based on a chimpanzee adenovirus. *J Virol*, 75(23), 11603-11613. doi: 10.1128/JVI.75.23.11603-11613.2001
- 50 Gao, G. P., Engdahl, R. K., & Wilson, J. M. (2000). A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther*, 77(1), 213-219. doi: 10.1089/10430340050016283
- 55 Geisbert, T. W., Bailey, M., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, J., Stanley, D., ... Sullivan, N. J. (2011). Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J Virol*, 85(9), 4222-4233. doi: 10.1128/JVI.02407-10
- Goerke, A. R., To, B. C., Lee, A. L., Sagar, S. L., & Konz, J. O. (2005). Development of a novel adenovirus purification process utilizing selective precipitation of cellular DNA. *Biotechnol Bioeng*, 91(1), 12-21. doi: 10.1002/bit.20406
- 60 Harro, C. D., Robertson, M. N., Lally, M. A., O'Neill, L. D., Edupuganti, S., Goepfert, P. A., ... Mehrotra, D. V. (2009). Safety and immunogenicity of adenovirus-vectored near-consensus HIV type 1 clade B gag vaccines in healthy adults. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 25(1), 103-114.
- Havenga, M., Vogels, R., Zuijdgeest, D., Radosevic, K., Mueller, S., Sieuwerts, M., ... Goudsmit, J. (2006). Novel replication-incompetent adenoviral B-group vectors: high vector stability and yield in PER.C6 cells. *J Gen Virol*, 87(Pt 8), 2135-2143.
- 65 Hoganson, D.K., Ma, J.C., Asato, L., Ong, M., Printz, M.A., Huyghe, B.G., ... D'Andrea, M.J. (2002). Development of

- a Stable Adenoviral Vector Formulation. *BioProcessing J.*, 1(1), 43-48.
- Holman, D. H., Wang, D., Raviprakash, K., Raja, N. U., Luo, M., Zhang, J., ... Dong, J. Y. (2007). Two complex, adenovirus-based vaccines that together induce immune responses to all four dengue virus serotypes. *Clin Vaccine Immunol*, 14(2), 182-189.
- 5 Holterman, L., Vogels, R., van der Vlugt, R., Sieuwerts, M., Grimbergen, J., Kaspers, J., ... Havenga, M. (2004). Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5. *J Virol*, 78(23), 13207-13215. doi: 10.1128/JVI.78.23.13207-13215.2004
- 10 Hu, X., Meng, W., Dong, Z., Pan, W., Sun, C., & Chen, L. (2011). Comparative immunogenicity of recombinant adenovirus-vectored vaccines expressing different forms of hemagglutinin (HA) proteins from the H5 serotype of influenza A viruses in mice. *Virus Res*, 155(1), 156-162. doi: 10.1016/j.virusres.2010.09.014
- Kobinger, G. P., Feldmann, H., Zhi, Y., Schumer, G., Gao, G., Feldmann, F., ... Wilson, J. M. (2006). Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology*, 346(2), 394-401. doi: 10.1016/j.virol.2005.10.042
- 15 Lasaro, M. O., & Ertl, H. C. (2009). New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther*, 17(8), 1333-1339. doi: 10.1038/mt.2009.130
- Lemckert, A. A., Grimbergen, J., Smits, S., Hartkoorn, E., Holterman, L., Berkhout, B., ... Havenga, M. J. (2006). Generation of a novel replication-incompetent adenoviral vector derived from human adenovirus type 49: manufacture on PER.C6 cells, tropism and immunogenicity. *J Gen Virol*, 87(Pt 10), 2891-2899. doi: 10.1099/vir.0.82079-0
- 20 Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., ... Massie, B. (2006). The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol*, 6, 43. doi: 10.1186/1472-6750-6-43
- Na, M., & Fan, X. (2010). Design of Ad5F35 vectors for coordinated dual gene expression in candidate human hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 38(6), 446-452. doi: 10.1016/j.exphem.2010.03.007
- 25 Nan, X., Peng, B., Hahn, T. W., Richardson, E., Lizonova, A., Kovsesi, I., & Robert-Guroff, M. (2003). Development of an Ad7 cosmid system and generation of an Ad7deltaE1deltaE3HIV(MN) env/rev recombinant virus. *Gene Ther*, 10(4), 326-336. doi: 10.1038/sj.gt.3301903
- Ogun, S. A., Dumon-Seignovert, L., Marchand, J. B., Holder, A. A., & Hill, F. (2008). The oligomerization domain of C4-binding protein (C4bp) acts as an adjuvant, and the fusion protein comprised of the 19-kilodalton merozoite surface protein 1 fused with the murine C4bp domain protects mice against malaria. *Infect Immun*, 76(8), 3817-3823. doi: 10.1128/IAI.01369-07
- 30 Ophorst, O. J., Radosevic, K., Havenga, M. J., Pau, M. G., Holterman, L., Berkhout, B., ... Tsuji, M. (2006). Immunogenicity and protection of a recombinant human adenovirus serotype 35-based malaria vaccine against *Plasmodium yoelii* in mice. *Infect Immun*, 74(1), 313-320.
- 35 Pham, L., Nakamura, T., Gabriela Rosales, A., Carlson, S. K., Bailey, K. R., Peng, K. W., & Russell, S. J. (2009). Concordant activity of transgene expression cassettes inserted into E1, E3 and E4 cloning sites in the adenovirus genome. *J Gene Med*, 11(3), 197-206.
- Radosevic, K., Rodriguez, A., Lemckert, A. A., van der Meer, M., Gillissen, G., Warnar, C., ... Goudsmit, J. (2010). The Th1 immune response to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein is boosted by adenovirus vectors 35 and 26 with a homologous insert. *Clin Vaccine Immunol*, 17(11), 1687-1694. doi: 10.1128/CI.00311-10
- 40 Schepp-Berglind, J., Luo, M., Wang, D., Wicker, J. A., Raja, N. U., Hoel, B. D., ... Dong, J. Y. (2007). Complex adenovirus-mediated expression of West Nile virus C, PreM, E, and NS1 proteins induces both humoral and cellular immune responses. *Clin Vaccine Immunol*, 14(9), 1117-1126.
- 45 Small, J. C., Kurupati, R. K., Zhou, X., Bian, A., Chi, E., Li, Y., ... Ertl, H. C. (2014). Construction and characterization of E1- and E3-deleted adenovirus vectors expressing two antigens from two separate expression cassettes. *Hum Gene Ther*, 25(4), 328-338. doi: 10.1089/hum.2013.216
- Sullivan, N. J., Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Shedlock, D. J., Xu, L., Lamoreaux, L., ... Nabel, G. J. (2006). Immune protection of nonhuman primates against Ebola virus with single low-dose adenovirus vectors encoding modified GPs. *PLoS Med*, 3(6), e177. doi: 10.1371/journal.pmed.0030177
- 50 Sullivan, N. J., Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Xu, L., Yang, Z. Y., Roederer, M., ... Nabel, G. J. (2003). Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature*, 424(6949), 681-684. doi: 10.1038/nature01876
- Szymczak, A. L., Workman, C. J., Wang, Y., Vignali, K. M., Dilioglou, S., Vanin, E. F., & Vignali, D. A. (2004). Correction of multi-gene deficiency *in vivo* using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol*, 22(5), 589-594. doi: 10.1038/nbt957
- 55 Tatsis, N., Blejer, A., Lasaro, M. O., Hensley, S. E., Cun, A., Tesema, L., ... Ertl, H. C. (2007). A CD46-binding chimpanzee adenovirus vector as a vaccine carrier. *Mol Ther*, 15(3), 608-617. doi: 10.1038/sj.mt.6300078
- Vemula, S. V., & Mittal, S. K. (2010). Production of adenovirus vectors and their use as a delivery system for influenza vaccines. *Expert Opin Biol Ther*, 10(10), 1469-1487. doi: 10.1517/14712598.2010.519332
- 60 Vogels, R., Zuijdgeest, D., van Meerendonk, M., Companjen, A., Gillissen, G., Sijtsma, J., ... Havenga, M. J. (2007). High-level expression from two independent expression cassettes in replication-incompetent adenovirus type 35 vector. *J Gen Virol*, 88(Pt 11), 2915-2924.
- Vogels, R., Zuijdgeest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Bethune, M. P., ... Havenga, M. (2003). Replication-deficient human adenovirus type 35 vectors for gene transfer and vaccination: efficient human cell infection and bypass of preexisting adenovirus immunity. *J Virol*, 77(15), 8263-8271.
- 65 Zhou, D., Cun, A., Li, Y., Xiang, Z., & Ertl, H. C. (2006). A chimpanzee-origin adenovirus vector expressing the rabies virus glycoprotein as an oral vaccine against inhalation infection with rabies virus. *Mol Ther*, 14(5), 662-672. doi:

10.1016/j.ymthe.2006.03.027

Zhou, D., Wu, T. L., Lasaro, M. O., Latimer, B. P., Parzych, E. M., Bian, A., ... Ertl, H. C. (2010). A universal influenza A vaccine based on adenovirus expressing matrix-2 ectodomain and nucleoprotein protects mice from lethal challenge. *Mol Ther*, 18(12), 2182-2189. doi: 10.1038/mt.2010.202

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Crucell Holland B.V. Wunderlich, Kerstin Custers, Jerome Vellinga, Jort Sanders, Barbara

<120> Adenovirus recombinante que expresan dos transgenes con un promotor direccional

10

<130> 0255 WO 00 ORD

<160> 4

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1958

<212> ADN

20

<213> Cytomegalovirus de ratón

<400> 1

cacggccaag gtcagcaccg cagcttttat cctgaagggc cgtgggggac ctggaggaga	60
agaagggcct ggctgagtgg gtgccttcag tatgcagaag ccccgctctc cccgaactca	120
gttgcagcca ggtgaggaga agggcacaga gcgggagaag acctcaggtc ccagaggccc	180
ggcctggggc aaggcctgaa ccttgagctg gggagccaga gtgaccgggg caggcagcag	240
gacgcacctc cttctcgag tctctaagca gccagctctt gcagggccta tttatgtgtt	300
aactgtaggtt gggctgatat gagccgggt cctgctctct ctgggctcga atggcatggg	360
ggacagcaat tatatggtta actccgccc ttttatgact agaaccaata gtttttaatg	420
ccaatgcac tgaaatcccc taatttgcaa agccaaacgc cccctatgtg agtaatacgg	480
ggacttttta cccaatttcc cacgcgaaa gcccctaact aactcatat ggcatatgaa	540
tcagcacggt catgcactct aatggcggcc catagggact ttccacatag gggcggttca	600
ccatttccca gcataggggt ggtgactcaa tggcctttac ccaagtacat tgggtcaatg	660
ggaggtgaag caatgggttt ttccattac tggcaagcac actgagtcaa atgggacttt	720
ccactgggtt ttgcccaagt acattgggtc aatgggaggt gagccaatgg gaaaaacca	780
ttgctgccaa gtacactgac tcaatagga ctttccaatg ggtttttcca ttgttgcaa	840
gcatataagg tcaatgtggg tgagtcaata gggactttcc attgtattct gcccagtaca	900
taaggtcaat agggggtgaa tcaacaggaa agtcccattg gagccaagta cactgctca	960
atagggactt tccattgggt tttgcccagt acataaggtc aataggggat gagtcaatgg	1020
gaaaaacca ttggagccaa gtacactgac tcaatagga ctttccattg ggttttggcc	1080
agtacataag gtcaataggg ggtgagtcaa caggaaagtt ccattggagc caagtacatt	1140
gagtcaatag ggactttcca atgggttttg cccagtacat aagggtcaatg ggaggtgaagc	1200

ES 2 733 593 T3

caatggggtt ttccattac tggcacgtat actgagtcac tagggacttt ccaatggggt 1260  
 ttgccagta cataaggcca ataggggtga atcaacagga aagtcccatt ggagccaagt 1320  
 aactgagtc aatagggact ttccattggg ttttgcccag tacaaaaggt caataggggg 1380  
 tgagtcaatg ggtttttccc attattggca cgtacataag gtcaataggg gtgagtcatt 1440  
 ggtttttccc agccaattta atttaaaccg catgtacttt cccaccattg acgtcaatgg 1500  
 gctattgaaa ctaatgcaac gtgacctta aacggtaact tcccatagct gattaatggg 1560  
 aaagtaccgt tctcgagcca atacacgtca atgggaagtg aaagggcagc caaacgtaa 1620  
 caccgccccg gttttcccct ggaaattcca tattggcacg cattctattg gctgagctgc 1680  
 gttctacgtg ggtataagag ggcgaccag cgtcgggtacc gtcgcagtct tcggtctgac 1740  
 caccgtagaa cgcagagctc ctcgctgcag ctgcagaagt tggtcgtgag gcaactgggca 1800  
 ggtaagtatc aaggttacaa gacaggttta aggagaccaa tagaaactgg gcttgtcgag 1860  
 acagagaaga ctcttgcgtt tctgatagge acctattggt cttactgaca tccactttgc 1920  
 cttctctccc acaggtgtcc actcccagtt caattaca 1958

<210> 2

<211> 1478

<212> ADN

<213> Citomegalovirus de ratón

<400> 2

gttaacgtag gtagggcgt atcgagccgc ggtcogtcct gctctgggct cgaatggcat 60  
 gggggacagc aattatatgg ttaactccgc ccgttttatg actagaacca atagttttta 120  
 atgccaaatg cactgaaatc ccctaatttg caaagccaaa cgcacctat gtgagtaata 180  
 cggggacttt ttacccaatt tcccacgagg aaagccccct aatacactca tatggcatat 240  
 gaatcagcac ggtcatgcac tctaattggc gcccataggg actttccaca tagggggcgt 300  
 tcaccatttc ccagcatagg ggtggtgact caatggcctt tacccaagta cattgggtca 360  
 atgggaggta agccaatggg tttttcccat tactggcaag cacactgagt caaatgggac 420  
 tttccactgg gttttgccc agtacattgg gtcaatggga ggtgagccaa tgggaaaac 480  
 ccattgctgc caagtacact gactcaatag ggactttcca atgggttttt ccattggttg 540  
 caagcatata aggtcaatgt ggggtgagtc atagggactt tcattgtat tctgcccagt 600  
 acataaggtc aatagggggt gaatcaacag gaaagtccca ttggagccaa gtacactgag 660  
 tcaataggga ctttccattg ggttttgccc agtacataag gtcaataggg gatgagtcac 720  
 tgggaaaac ccattggagc caagtacact gactcaatag ggactttcca ttgggttttg 780  
 cccagtacat aaggccaata ggggtgagtc caacaggaaa gttccattgg agccaagtac 840  
 attgagtcac tagggacttt ccaatggggt ttgcccagta cataaggcca atgggaggta 900

5

10

ES 2 733 593 T3

agccaatggg tttttcccat tactggcagc tatactgagt cattagggac tttccaatgg 960  
 gttttgccca gtacataagg tcaatagggg tgaatcaaca ggaaagtccc attggagcca 1020  
 agtacctga gtcaataggg actttccatt gggttttgcc cagtacaaa ggtcaatagg 1080  
 gggtgagtca atgggttttt cccattattg gacgtacat aaggtaata ggggtgagtc 1140  
 attgggtttt tccagccaat ttaatttaaa cgccatgtac tttcccacca ttgacgtcaa 1200  
 tgggctattg aaactaatgc aacgtgacct ttaaaccgga ctttcccata gctgattaat 1260  
 gggaaagtac cgttctcgag ccaatacacg tcaatgggaa gtgaaagggc agccaaaacg 1320  
 taacaccgcc cgggttttcc cctggaaatt ccatattggc acgcattcta ttggctgagc 1380  
 tgcgttctac gtgggtataa gaggcgcgac cagcgtcggc accgtcgcag tcttcggtct 1440  
 gaccaccgta gaacgcagag ctccctcgtg cagctgca 1478

<210> 3  
 <211> 183  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Intrón quimérica

10

<400> 3

gaagttggtc gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag 60  
 accaatagaa actgggcttg tgcgacaga gaagactctt gcgtttctga taggcacctt 120  
 ttggtcttac tgacatccac tttgccttcc tctccacagg tgtccactcc cagtcaatt 180  
 aca 183

<210> 4  
 <211> 297  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 4

acataaatag gccctgcaag agctggctgc ttagagactg cgagaaggag gtgcgtcctg 60  
 ctgcctgccc cggctactct ggctccccag ctcaaggctc aggccttgcc ccaggccggg 120  
 cctctggtac ctgaggctct ctcccgtctt gtgcccttct cctcacctgg ctgcaactga 180  
 gttcggggag cacggggctt ctgcatactg aaggcaccca ctccagccagg cccttcttct 240  
 cctccaggtc ccccacggcc cttcaggata aaagctgcgg tgctgacctt ggccgtg 297

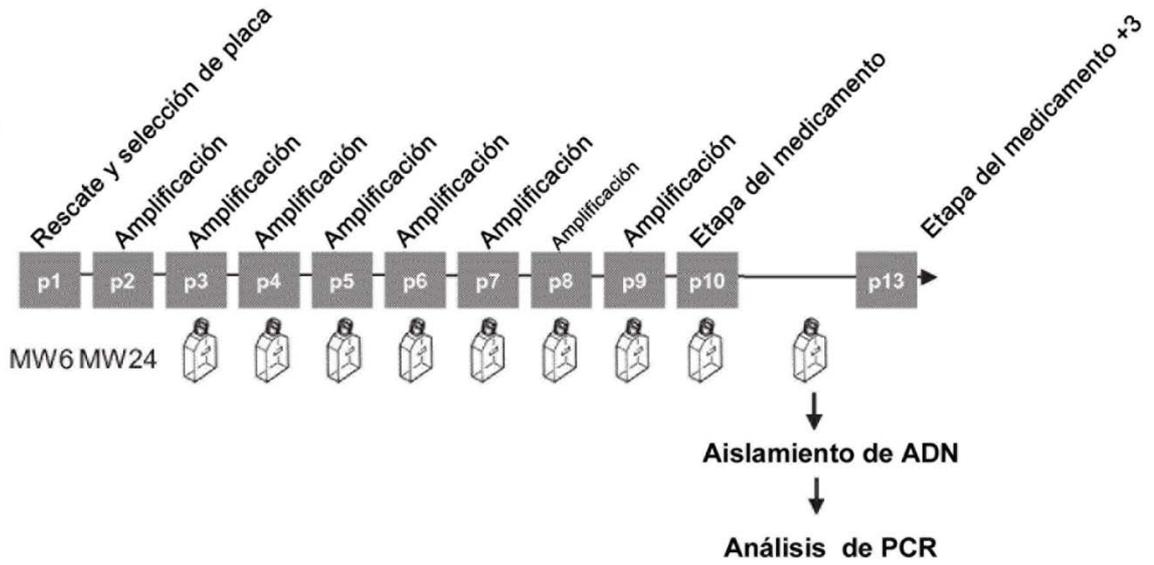
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un adenovirus recombinante que comprende un promotor de CMV de ratón (mCMV) bidireccional unido operativamente a un primer transgén en una dirección y a un segundo transgén en la dirección opuesta.
2. Un adenovirus recombinante según la reivindicación 1, que además comprende un intrón ubicado 3' del promotor y 5' del primer transgén y un intrón ubicado 3' del promotor y 5' del segundo transgén.
- 10 3. Un adenovirus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el adenovirus tiene una supresión en la región E1.
4. Un adenovirus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el primer y segundo transgén son diferentes y al menos uno de ellos codifica un antígeno.
- 15 5. Un adenovirus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el adenovirus es un adenovirus humano serotipo 35 o un adenovirus humano serotipo 26.
- 20 6. Un procedimiento para producir un adenovirus recombinante genéticamente estable que comprende un primer y un segundo transgén cada uno de los cuales se expresa potentemente cuando el adenovirus infecta una célula blanco, el procedimiento comprende:
- a) preparar un constructo que comprende un promotor de mCMV bidireccional operativamente unido a un primer transgén en una dirección y a un segundo transgén en la dirección opuesta; y
- 25 b) incorporar dicho constructo en el genoma del adenovirus recombinante.
7. Un procedimiento según la reivindicación 6, donde el constructo además comprende un intrón ubicado 3' del promotor y 5' del primer transgén y un intrón ubicado 3' del promotor y 5' del segundo transgén.
- 30 8. Un procedimiento según la reivindicación 6 o 7, donde el adenovirus recombinante tiene una supresión en la región E1 de su genoma.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el primer y segundo transgén son diferentes y al menos uno de ellos codifica un antígeno.
- 35 10. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, donde el adenovirus recombinante es un adenovirus humano serotipo 35 o un adenovirus humano serotipo 26.
- 40 11. Un procedimiento *in vitro* para expresar al menos dos transgenes en una célula, el procedimiento que comprende proporcionar una célula con un vector adenoviral recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
12. Un vector adenoviral recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para usar en la inducción de una respuesta inmune contra al menos dos antígenos.
- 45 13. Una molécula de ADN recombinante que comprende el genoma de un adenovirus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 50 14. Una composición farmacéutica que comprende un adenovirus recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

(A) **Diseño rHAdV monovalente**



(B)



(C)

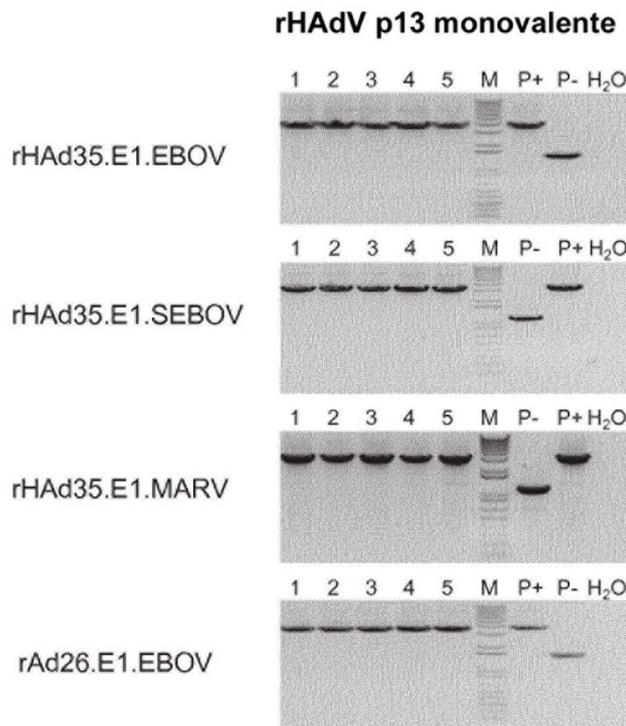
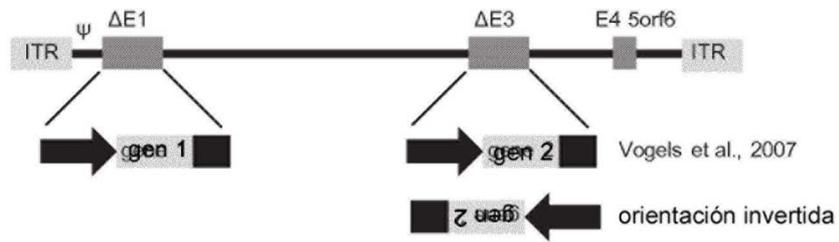


Fig. 1

**(A) Diseño rHAdV E1-E3 bivalente**



**(B) rHAD35.E1.EBOV-E3.SEBOV bivalente**

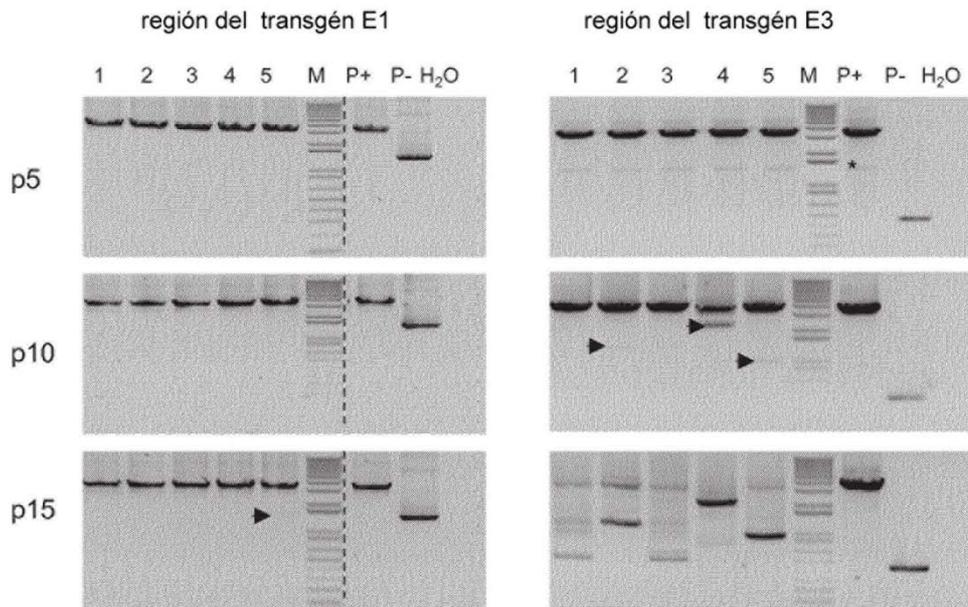


Fig. 2

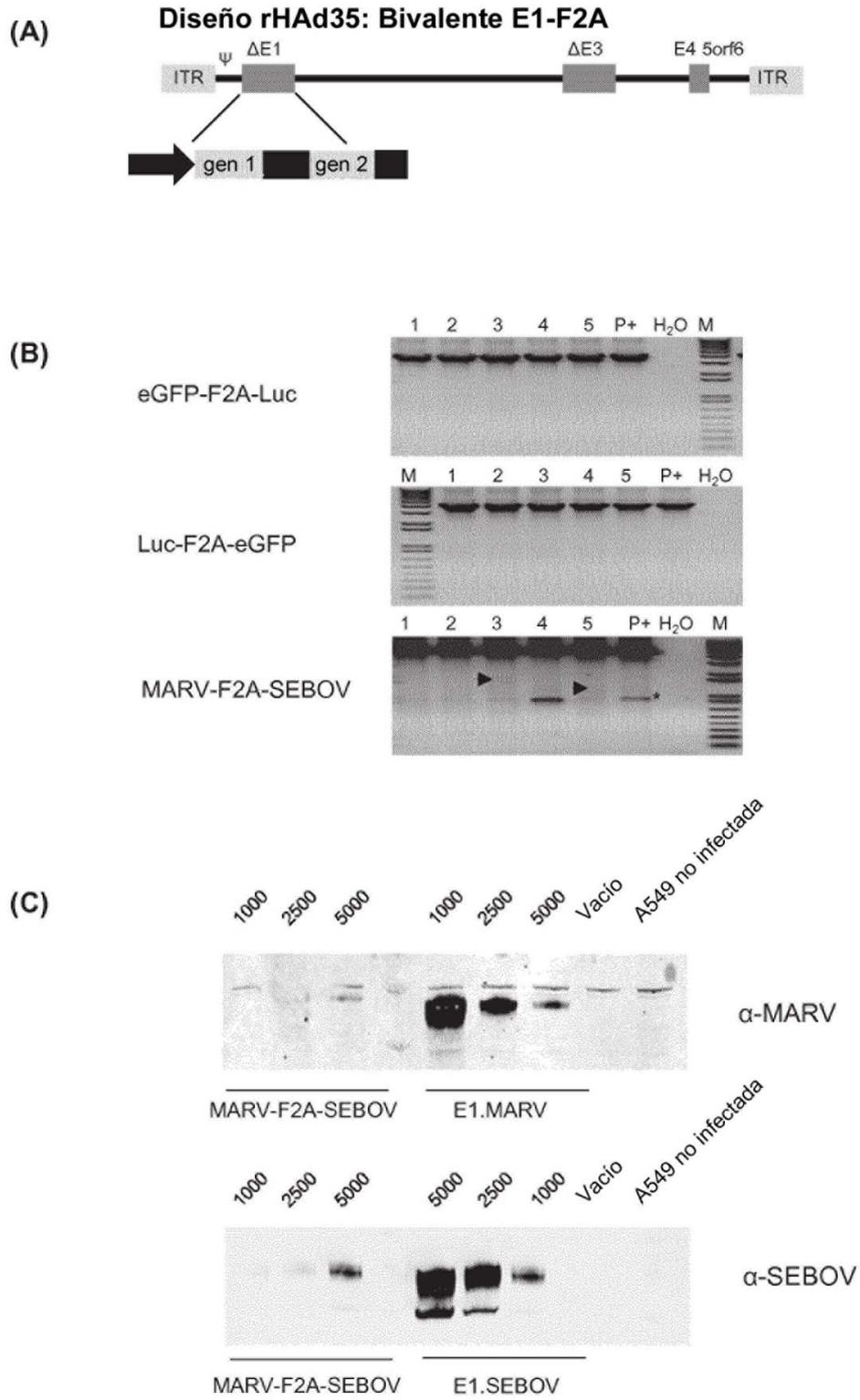


Fig. 3

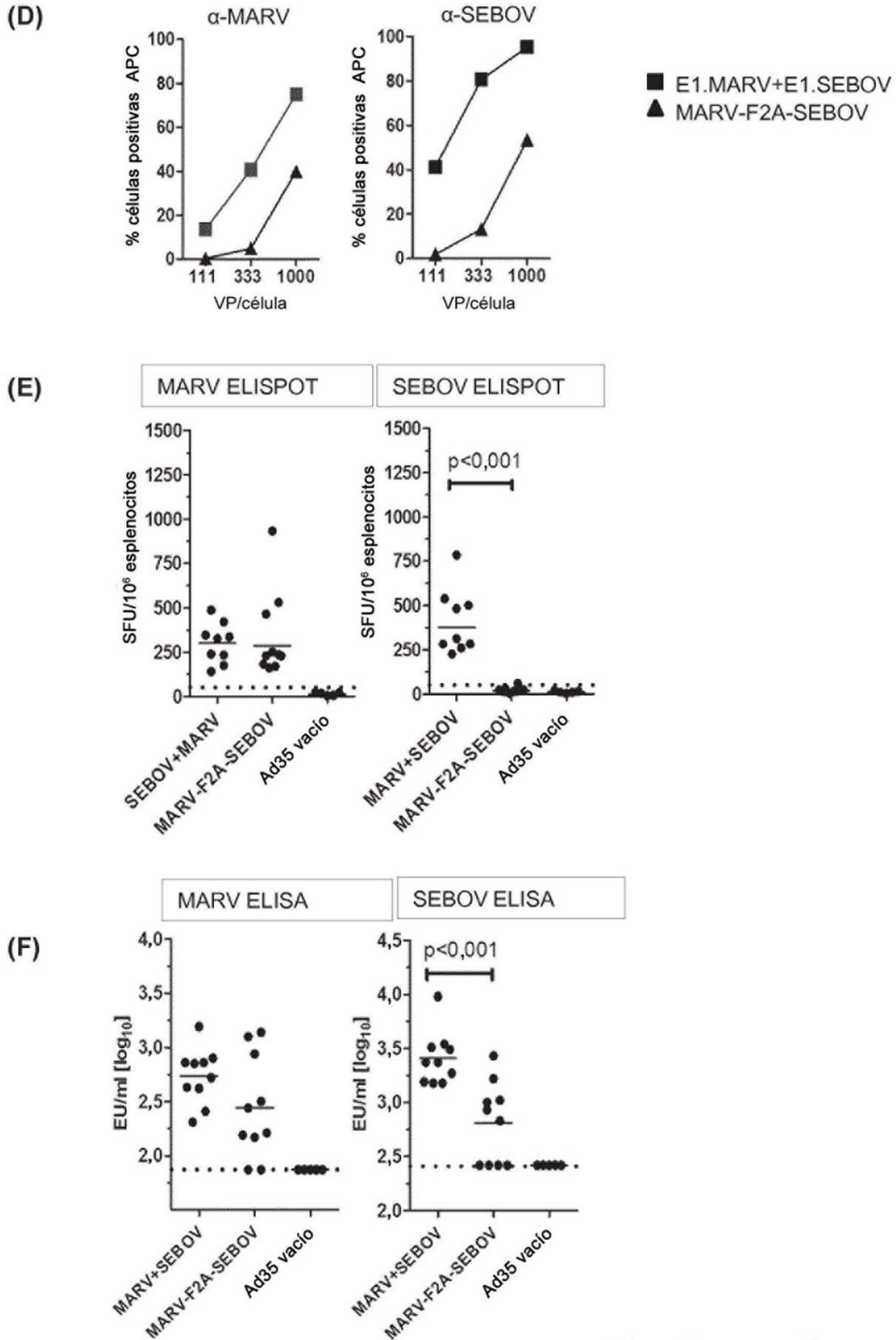
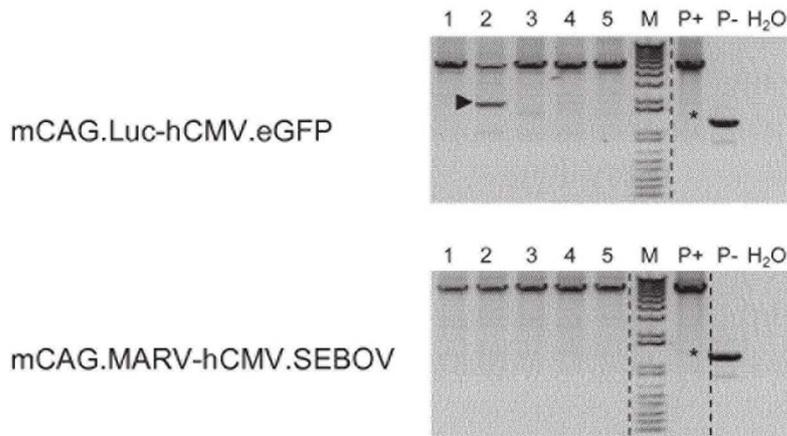


Fig. 3 - continuación

(A) Diseño rHAd35: Bivalent E1-E1



(B)



(C)

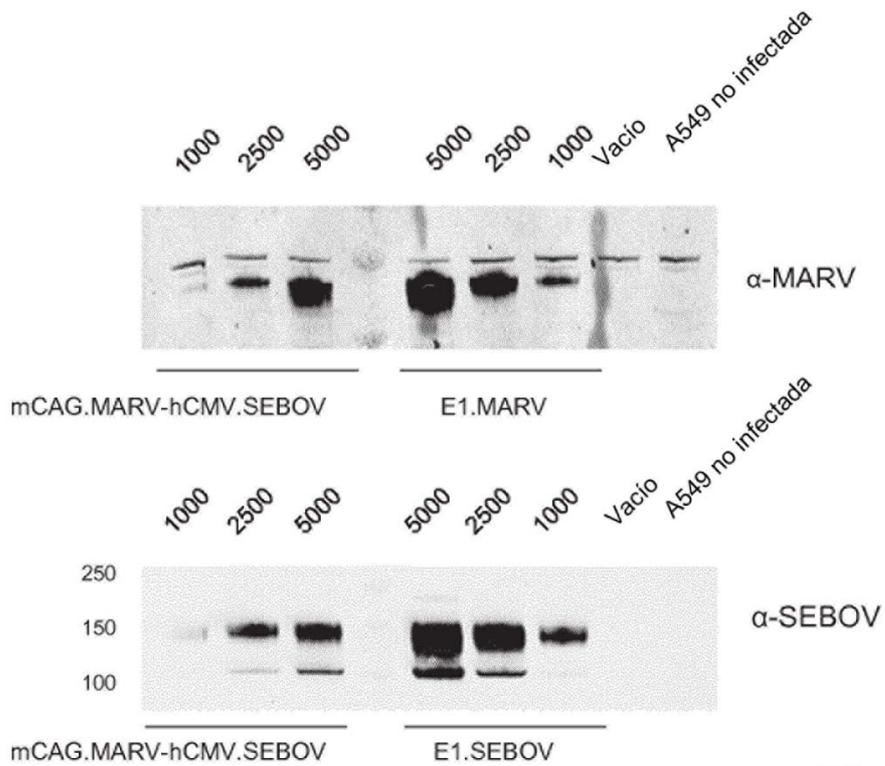


Fig. 4

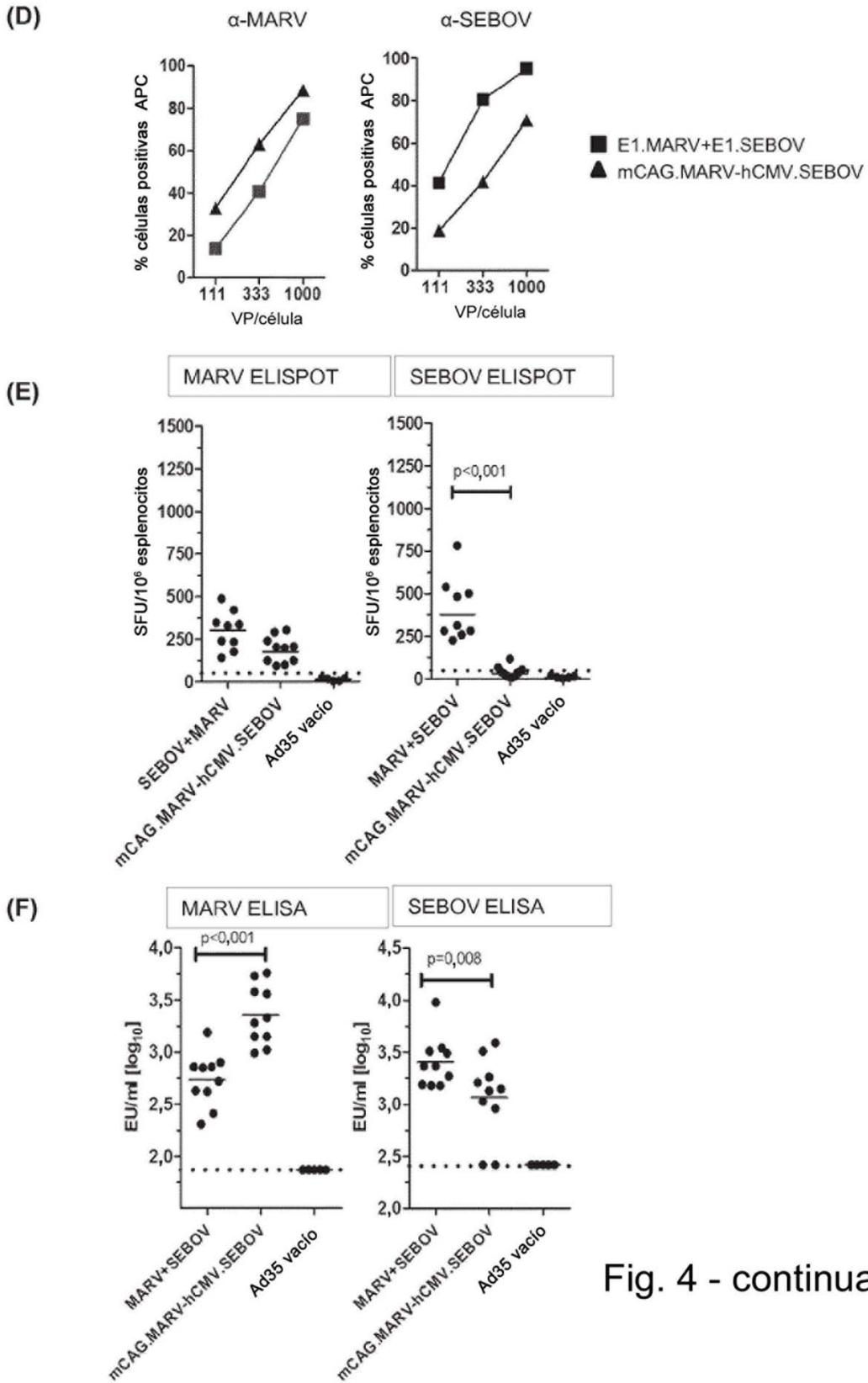


Fig. 4 - continuación

(A)

**Casete de expresión bidireccional**



(B)

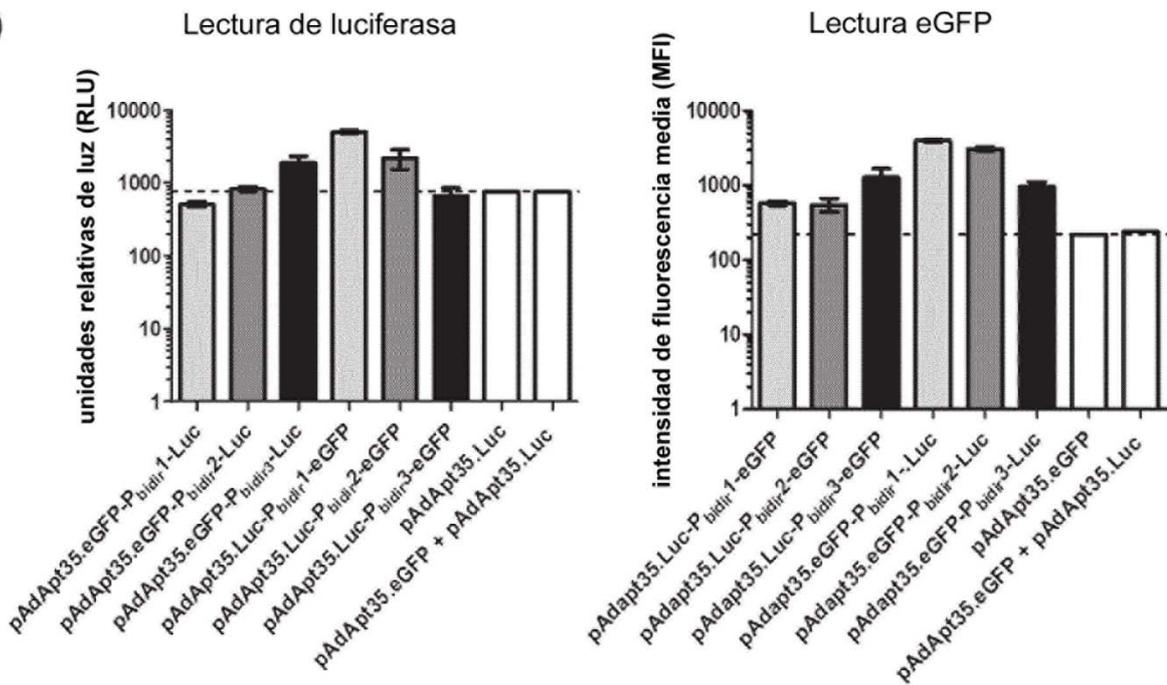
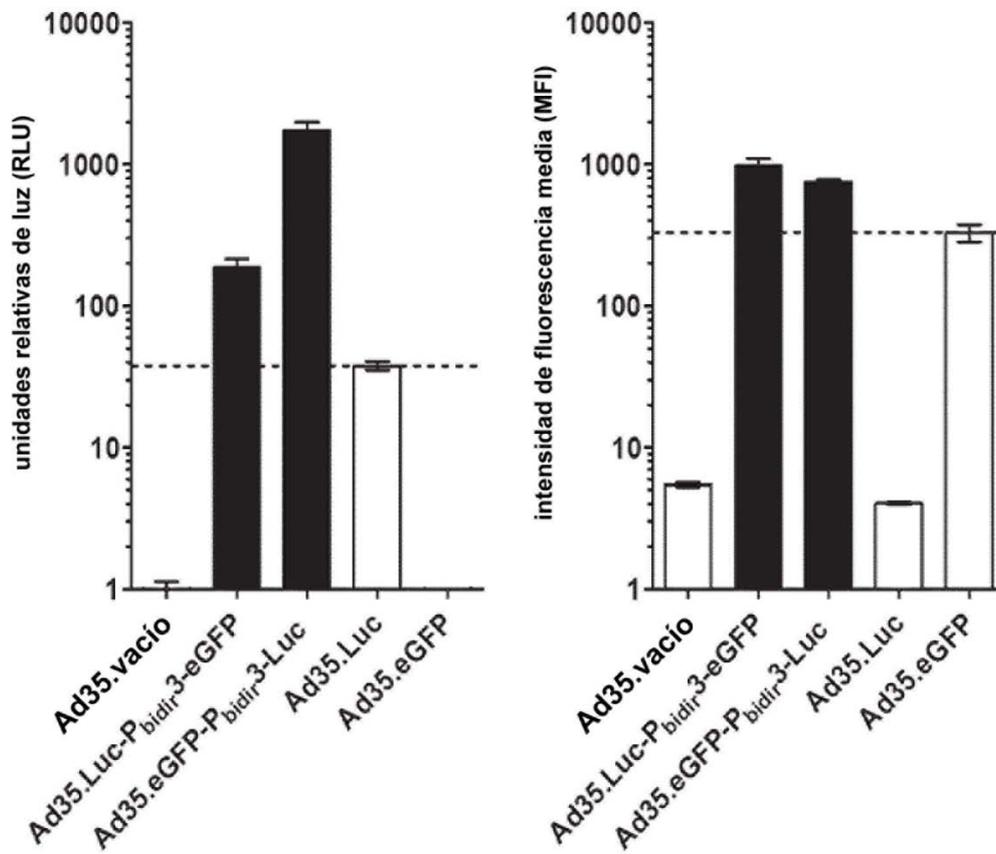


Fig. 5

(C)



(D) P<sub>bidir3</sub>: mCMV

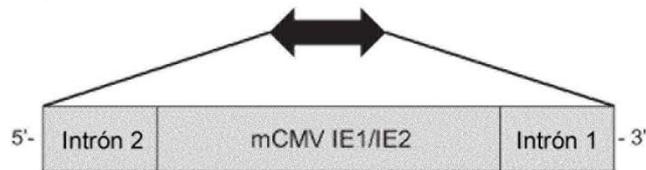


Fig. 5 - continuación

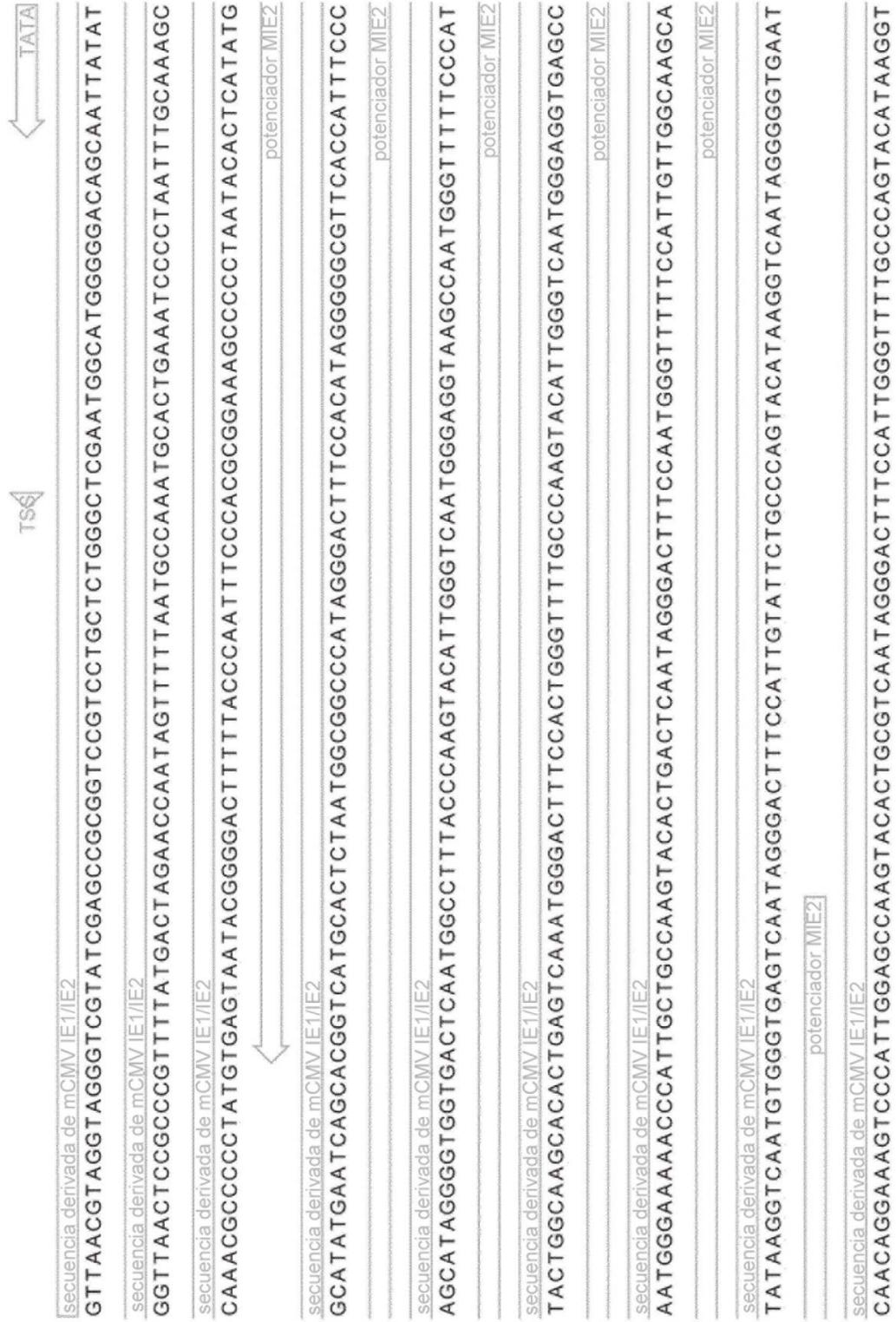


Fig. 6

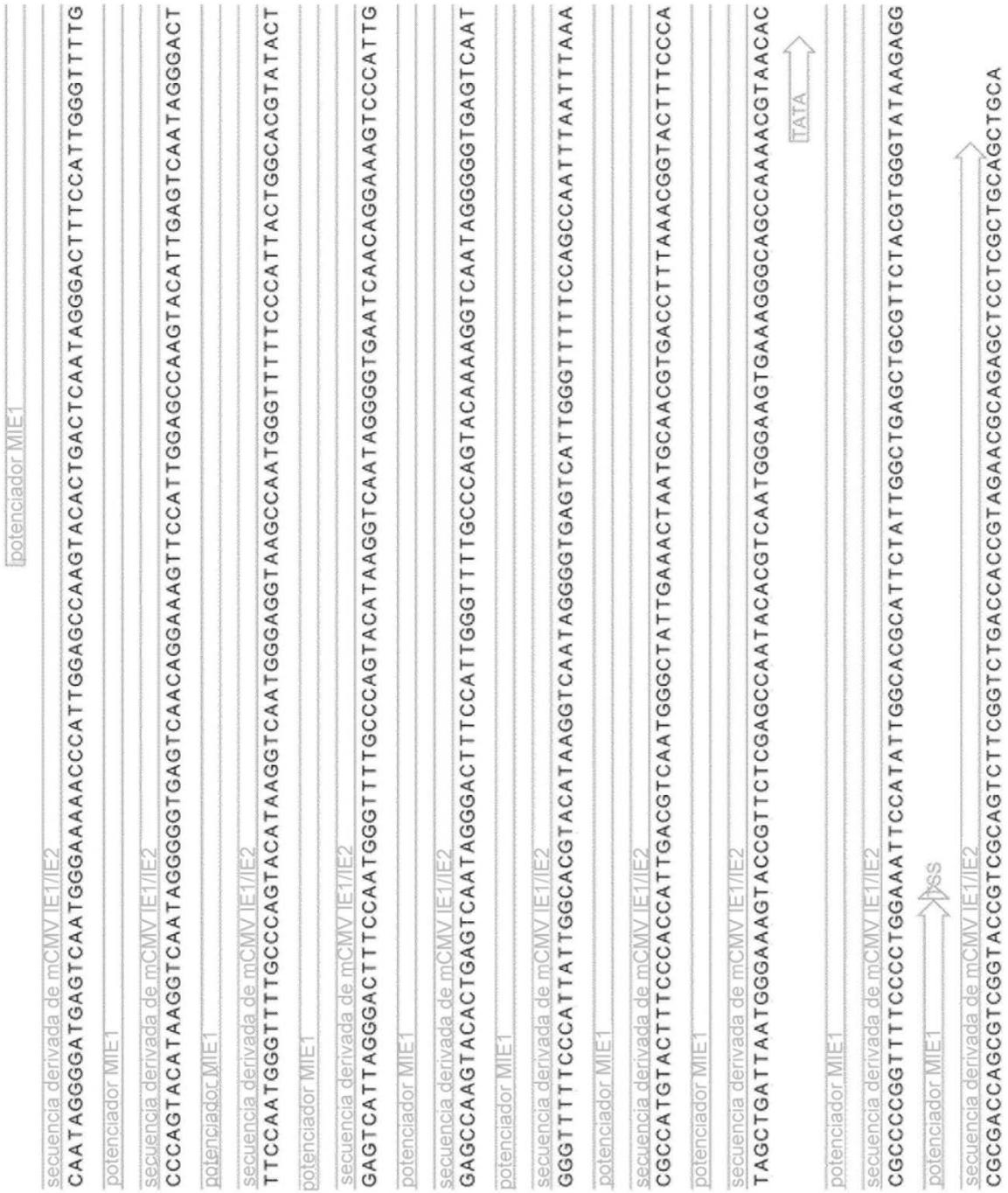


Fig. 6 - continuación

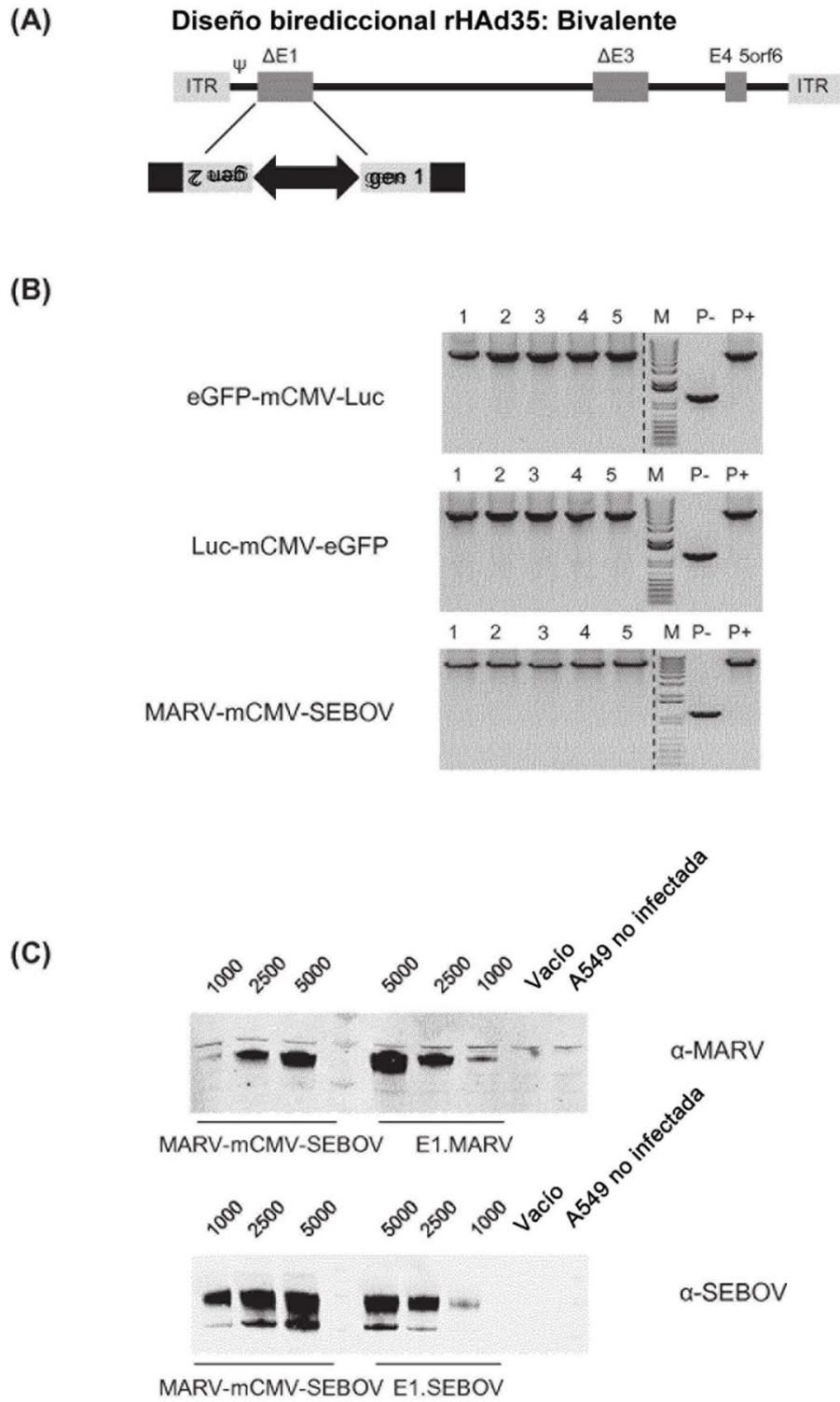


Fig. 7

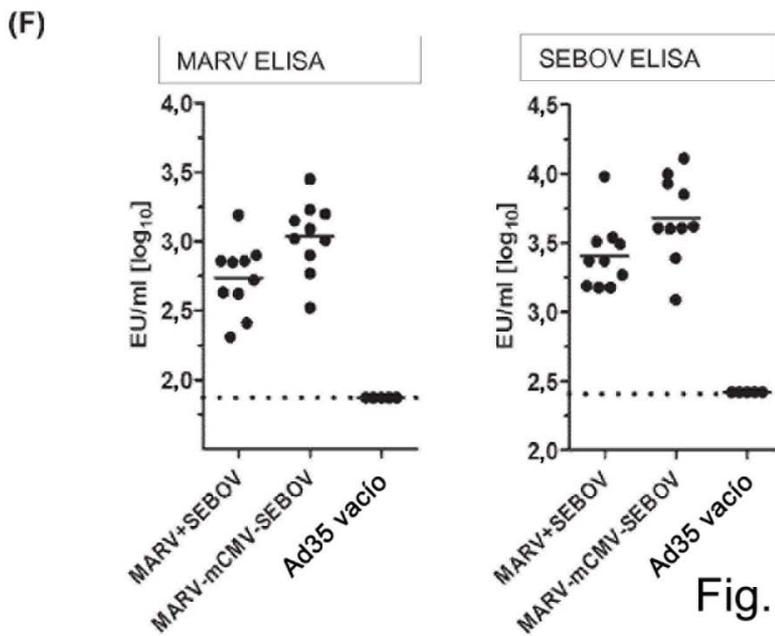
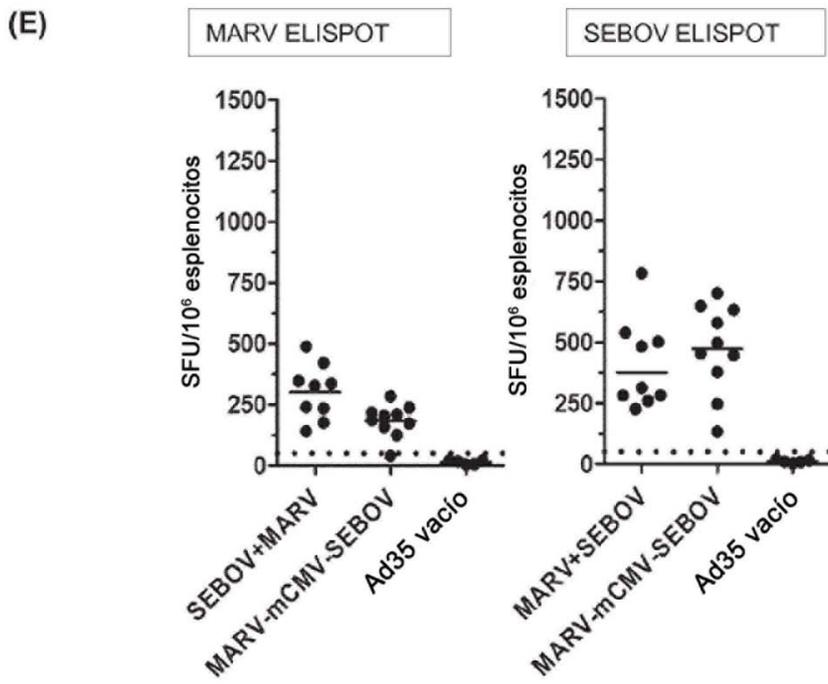
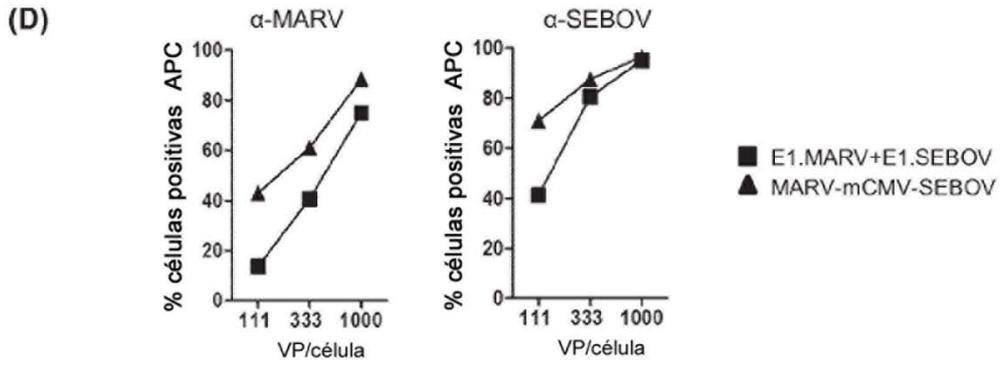


Fig. 7 - continuación

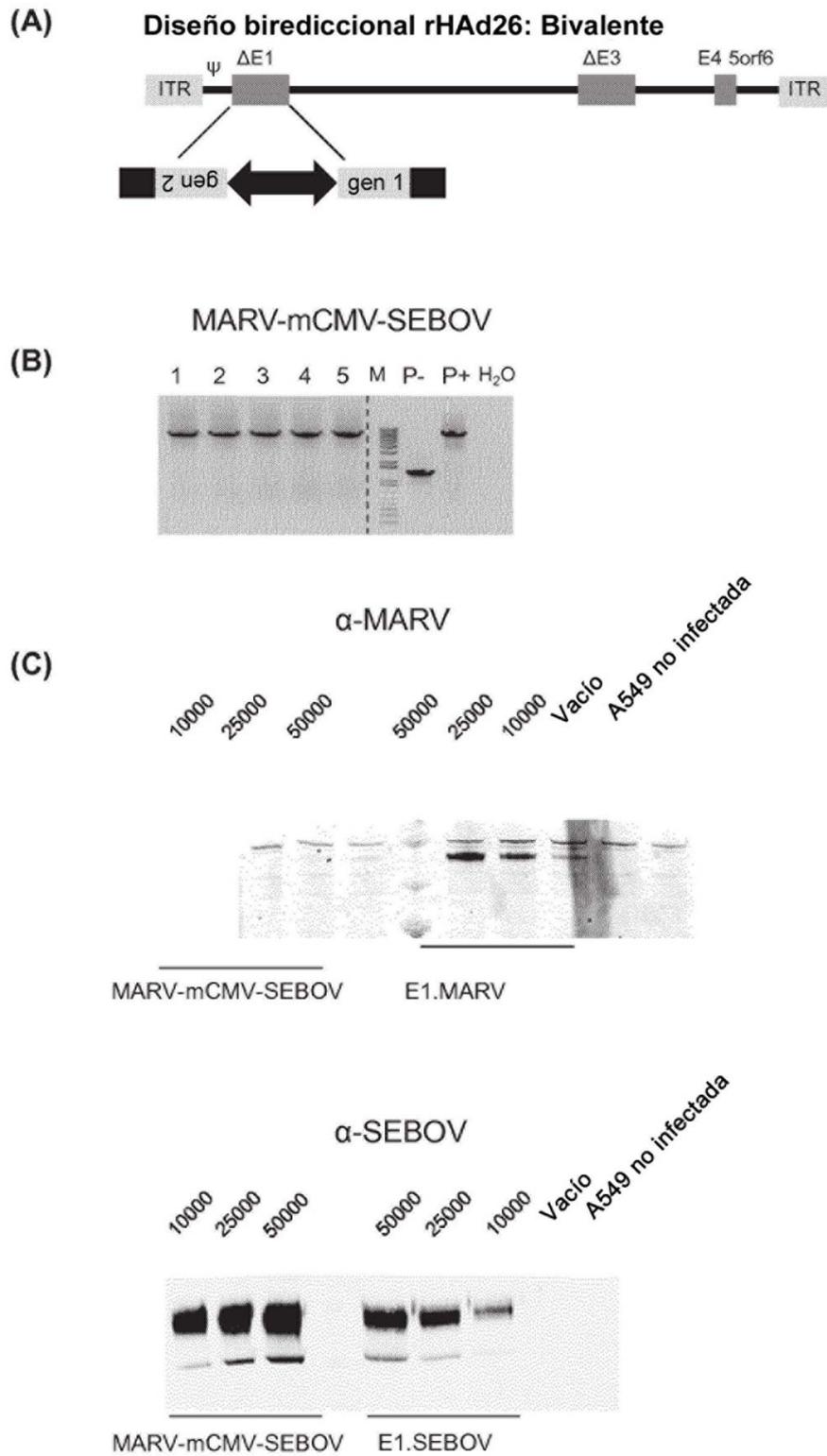


Fig. 8

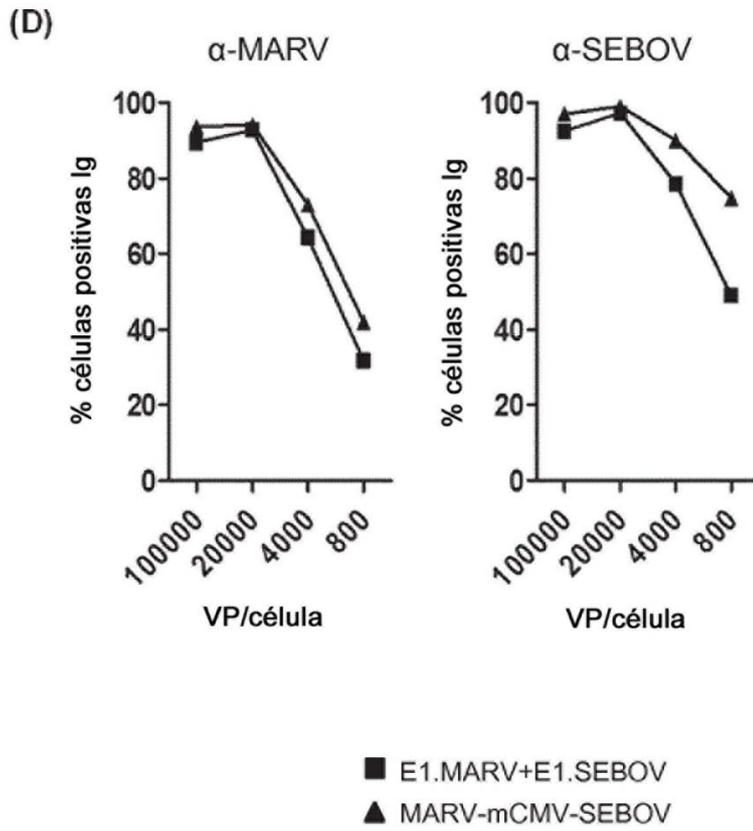


Fig. 8 - continuación

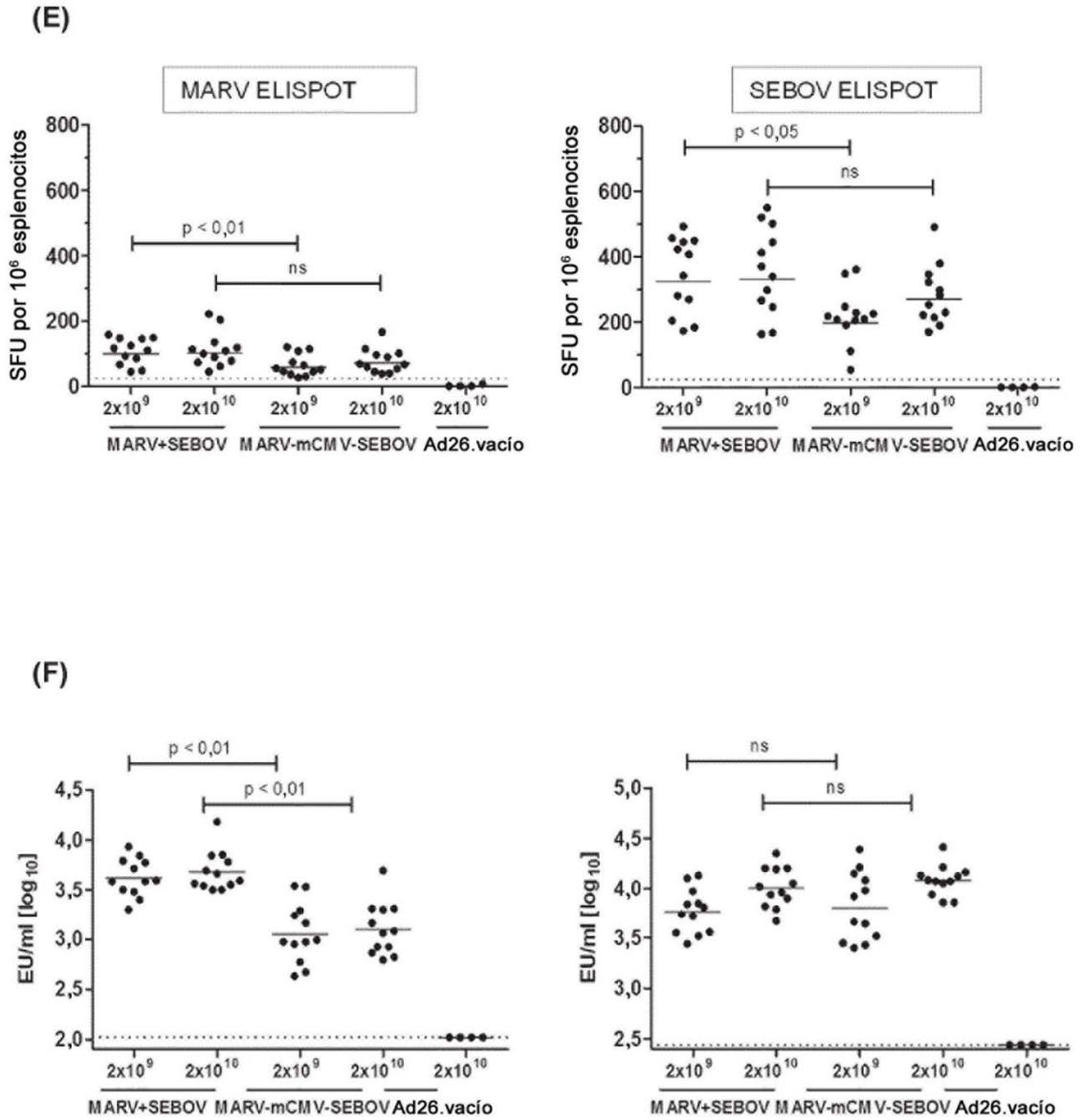


Fig. 8 - continuación