



(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 7/02 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070897

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de diciembre de 2011 (22.12.2011)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201031938
24 de diciembre de 2010 (24.12.2010) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA [ES/ES]; Edifici A, Campus universitari s/n, E-08193 Bellaterra (Cerdanyola del Valles) (ES). **INSTITUT CATALÀ DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS** [ES/ES]; Passeig Lluís Companys, 23, E-08010 Barcelona (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **CHILLON RODRÍGUEZ, Miguel** [ES/ES]; Edificio M, Campus universitari UAB, s/n, E-08193 Bellaterra (ES). **RODRÍGUEZ AGUILAR, Ester** [ES/ES]; Edificio H, Campus Universitario UAB, s/n, E-08193 Bellaterra (ES). **MIRALLES CONSUEGRA, Marta** [ES/ES]; Edificio H, Campus universitario UAB, s/n, E-08193 Bellaterra (ES). **BOSCH MERINO, Assumpció** [ES/ES]; Edificio H, Campus Universitario UAB, s/n, E-08193 Bellaterra (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: MOSAIC ADENOVIRUS PRODUCTION METHOD

(54) Título : MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS MOSAICO

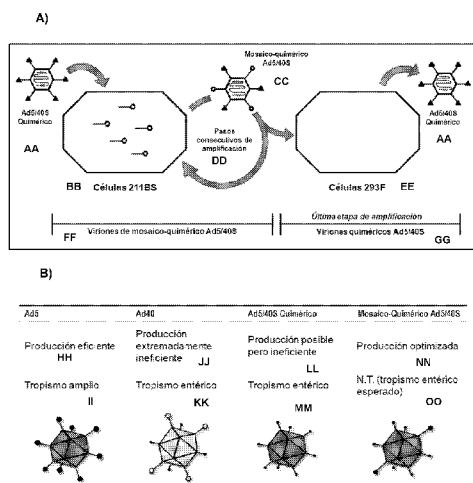


FIG. 3

AA Chimeric Ad5/40s
BB Cells 211BS
CC Mosaic-chimeric Ad5/40s
DD Consecutive amplification steps
EE Cells 293F
FF Virions of mosaic-chimeric Ad5/40s
GG Last amplification step
Chimeric virions Ad5/40s
HH Efficient production
II Broad tropism
JJ Extremely inefficient production
KK Enteric tropism
LL Possible but inefficient production
MM Enteric tropism
NN Optimised production
OO N.T. (enteric tropism expected)

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production of mosaic hybrid adenovirus having the capsid of a first type of adenovirus and fibres of said first type and a second type. In particular, the invention relates to the production of adenovirus Ad5/40, comprising: i) infecting permissive cells, which are adapted for growth in suspension and which express fibre of the first type, with an adenovirus having a capsid of the first type and fibre of the second type, in the presence of a polycation (preferably polybrene); ii) culturing said cells; and iii) recovering the mosaic hybrid viral particles. Finally, the particles can be amplified into cells adapted for growth in suspension, which do not express the fibre of the first type of adenovirus, with the particles of the hybrid adenovirus being recovered. The invention also relates to kits and to the uses of said method.

(57) Resumen: La presente invención, se relaciona con un método para la producción de adenovirus híbridos mosaico, que presenta la cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo y de un segundo, en especial la producción del adenovirus Ad5/40, que comprende: i) infectar células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión que expresan la fibra del primer tipo, con un adenovirus que presenta la cápside del primer tipo y la fibra del segundo, en presencia de un polication (preferentemente polibreno); ii) cultivar dichas células; iii) recuperar las partículas virales híbridas mosaico. Por último, se pueden amplificar las partículas en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose las partículas del adenovirus híbrido. También se incluyen los kits y usos de dicho método.



BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,

BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS MOSAICO

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se relaciona con un método para la producción de adenovirus mosaico y con los kits y usos de dicho método.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La terapia génica es una de las disciplinas de la biomedicina que ha permitido desarrollar técnicas y protocolos con potencial terapéutico para tratar enfermedades de origen genético. La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (ADN y ARN) con finalidad terapéutica en una célula diana, para aumentar o disminuir la expresión génica de un gen específico. En general, el tratamiento de la
- 15 mayoría de enfermedades genéticas por terapia génica somática requiere la expresión de un gen terapéutico durante toda la vida del paciente. Por ello, el desarrollo de vectores seguros que permitan la expresión del gen o genes de interés codificados por el ácido nucleico introducido (el transgén) durante largos periodos de tiempo, y que evite la respuesta inmune del paciente, es imprescindible para que
- 20 estos vectores puedan utilizarse en protocolos de terapia génica *in vivo*.

- Actualmente, los adenovirus (a los que se alude también mediante la abreviatura Ad) se han convertido en uno de los vectores más utilizados en ensayos clínicos en humanos, debido a los siguientes factores: el Ad puede infectar un elevado número
- 25 de tipos celulares, tanto células quiescentes como células en división; las técnicas actuales de producción de Ad permiten modificar su cápside y de esta manera su tropismo celular; además, son fáciles de producir a títulos altos (hasta 10¹³ partículas/mililitro); y son virus no integrativos, con lo que se evita la mutagénesis insercional.

30

Los adenovirus son virus de doble cadena de ADN que protegen su material genético mediante una cápside proteica de geometría icosaédrica, sin envuelta exterior, de cuyos vértices parten unas delgadas prolongaciones llamadas fibras. Su genoma viral contiene aproximadamente 36 Kb, flanqueado por dos ITR

- (repeticiones terminales invertidas) de entre 100 y 140 pb, cada una de las cuales constituye uno de los extremos del genoma adenoviral y tiene como función principal el inicio de la replicación del virus. Muy próxima a una de estas ITR se localiza la señal de empaquetamiento (ψ), que es la que dirige la encapsidación del
- 5 genoma viral dentro de la cápside gracias a la interacción con diferentes proteínas adenovirales, y que se caracteriza por contener repeticiones de tipo A (TTTGN₈CG) en un número variable, que depende del serotipo. Al extremo del genoma del adenovirus cerca del cual se localiza la señal de empaquetamiento se le suele considerar como el extremo 5', pues es también el extremo que tiene más próxima la
- 10 región El, que contiene los genes que se expresan en primer lugar. El genoma está dividido en genes tempranos (El-E4), que se transcriben en las primeras fases del ciclo, justo antes de la replicación del ADN viral, y en genes tardíos (L1-L5), transcritos en una fase posterior (producción proteica y encapsidación).
- 15 Se han identificado más de 100 serotipos de adenovirus, de los cuales unos son capaces de infectar mamíferos y otros aves. Entre los adenovirus que infectan mamíferos se encuentran adenovirus capaces de afectar a los seres humanos, organismos cuya principal diana es el tracto respiratorio, en el que es típico que provoquen resfriados o incluso faringitis.
- 20 Algunos adenovirus pueden causar también distintos tipos de conjuntivitis y, con menor frecuencia, cistitis y gastroenteritis. Los adenovirus son capaces de infectar otros órganos, aunque es habitual que den lugar en ellos a infecciones asintomáticas.
- 25 Con la finalidad de mejorar el tropismo de algunos de estos serotipos, se han creado adenovirus quiméricos que presentan la cápside de un tipo de adenovirus y la fibra de otro tipo de adenovirus. O incluso fibras quimera formadas por fragmentos de diferentes tipos de adenovirus.
- 30 Un caso particular es el del adenovirus humano de serotipo 40, que es un adenovirus entérico que forma parte del subgrupo F (AdF). Este serotipo adenoviral es un importante agente etiológico de gastroenteritis en niños (Cunliffe NA y cols. *Emerg Infect Dis* 2010, 16:55-62; Uhnou I y cols. *J Clin Microbiol* 1984, 20:365-372; Wilhelmi I y cols. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9:247-262), y un vector muy

interesante para terapia génica en enfermedades intestinales, tales como la enfermedad de Crohn, puesto que presenta un tropismo entérico. Ad40 no puede crecer en HeLa y en otras líneas celulares, pero sí puede propagarse en células HEK-293 (Brown M y cols. J Virol 1992, 66:3198-3205; Hashimoto S y cols. J Virol 1991; 65:429-2435). Habitualmente, la primera interacción del adenovirus con la célula huésped se produce entre la proteína de la fibra del adenovirus y el receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR) de la superficie celular a infectar. Se ha descrito que Ad40 contiene dos fibras diferentes: una larga y otra corta. La fibra larga se une a CAR, mientras que la fibra corta no lo hace y se ha sugerido que es la responsable del tropismo entérico de dicho adenovirus.

Aunque el Ad40 es capaz de infectar células HEK-293, su producción *in vitro* aún no es lo suficientemente eficiente, ya que Ad40 se produce en bajos títulos en comparación con otros subgrupos adenovirales (Sherwood V y cols. J Gen Virol 2007, 88:71-6). Para superar la dificultad en la producción de Ad40 y el amplio tropismo de la vía de entrada dependiente de CAR, se han diseñado vectores quiméricos Ad5/40S, compuestos por la cápside del Ad5 y la proteína de la fibra corta del Ad40 (F40S). Estos vectores quiméricos tienen la ventaja de aunar el hipotético tropismo entérico de F40S junto con la caracterización exhaustiva del genoma/proteoma de Ad5, debido a su uso en ensayos clínicos humanos (Journal of Genetic Medicine Website, www.wiley.co.uk/genmed/clinical). Como se ha demostrado recientemente, los vectores quiméricos Ad5/40S conservan el tropismo intestinal conferido por la proteína de la fibra corta del Ad40 y la resistencia a pH ácidos (Rodriguez E y cols. Mol Ther 2006,12:S5), que es esencial en la administración oral, ya que los vectores han de atravesar el estómago exponiéndose a pH ácidos antes de llegar al intestino.

Diferentes grupos de investigación han desarrollado protocolos para amplificar vectores quiméricos incluyendo Ad5/41 y Ad5/40 (Tiemessen CT y cols, J. Virol 1994 68:1239-1244). Sin embargo, aunque la producción *in vitro* del adenovirus quimérico Ad5/40S es más eficiente que la del Ad40 salvaje, la productividad por célula aún no es lo suficientemente alta y los protocolos son largos y consumen tiempo.

Por lo tanto, sería deseable disponer de un protocolo de amplificación de adenovirus híbridos o quiméricos, y en particular de vectores quiméricos Ad5/40S, que permita su producción a gran escala.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un adenovirus híbrido mosaico que comprende una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo

10 tipo de adenovirus que comprende

- (i) infectar células permisivas que expresan la fibra de un primer tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de dicho primer tipo de adenovirus y fibras de un segundo tipo de adenovirus distinto al primer tipo de adenovirus,
- 15 (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en condiciones que permitan la amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo de replicación del adenovirus y/o de la célula permisiva,
- (iii) recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii) y,
- 20 (iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) en donde las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) se utilizan para la infección en la etapa (i) del siguiente ciclo de amplificación,

en donde las células permisivas son células adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un polication.

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico comprendiendo dicho adenovirus una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de al menos dos tipos de adenovirus, siendo uno de los tipos de adenovirus de las fibras del mismo tipo que la cápside, donde dicho

30 kit comprende:

- a) al menos una línea celular permisiva que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus apta para el cultivo en suspensión y
- b) un polication

Aún en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la invención para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. A) Curva de crecimiento celular y viabilidad de las células 211BS adaptadas al crecimiento en suspensión. **B)** Tiempo de duplicación de la línea celular 211BS adaptada al crecimiento en suspensión.

10 **Figura 2.** Eficiencia de infección de las células 211BS por Ad5/40S con polibreno. Se muestra el porcentaje de las células infectadas mediante la cuantificación de la expresión de GFP (proteína verde fluorescente).

Figura 3. A) Esquema de la producción de adenovirus quiméricos Ad5/40S según el método de la invención. **B)** Características de los diferentes tipos de adenovirus relacionados con la producción de Ad5/40S. N.T.: No Testado.

Figura 4. Ciclo de los adenovirus mosaico Ad5/40S en células 211BS. IU: Unidades Infectivas del virus.

20

Figura 5. Diagrama (A) y tabla (B) comparativos entre el protocolo nuevo y el clásico. IU: Unidades Infectivas del virus; PP: partículas físicas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25

Los autores de la presente invención han desarrollado un método que, de forma sorprendente, permite una amplificación eficiente y escalable de adenovirus híbridos de difícil obtención y, especialmente, de adenovirus híbridos Ad5/40, reduciendo a un tercio el número de etapas de amplificación, el tiempo y el coste, así como reduciendo también el riesgo de generación de viriones competentes en replicación.

30

Para ello, los inventores han utilizado células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión que expresan la fibra de un tipo de adenovirus distinto al de la fibra

del adenovirus híbrido que se pretende amplificar y del mismo tipo que la cápside de dicho adenovirus, y han realizado la infección de dichas células en presencia de un polication. Las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico recuperadas pueden someterse posteriormente a una etapa final de amplificación en células que

5 no expresan la fibra del tipo de adenovirus anterior para recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido original, es decir, de adenovirus híbrido no mosaico.

MÉTODO DE LA INVENCION

- 10 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un adenovirus híbrido mosaico que comprende una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus que comprende
- 15 (i) infectar células permisivas que expresan la fibra de un primer tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de dicho primer tipo de adenovirus y fibras de un segundo tipo de adenovirus distinto al primer tipo de adenovirus,
 - (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en condiciones que permitan la amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo
 - 20 de replicación del adenovirus y de la célula permisiva,
 - (iii) recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii) y,
 - (iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) en donde las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) se utilizan para la infección en la
 - 25 etapa (i) del siguiente ciclo de amplificación,
- en donde las células permisivas son células adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un polication.

Por “adenovirus” se entiende en la presente invención todos aquellos virus

30 pertenecientes a la familia *Adenoviridae*, que poseen un genoma de ADN bicatenario lineal, carecen de envoltura y tienen forma icosaédrica. Los adenovirus son capaces de infectar tanto a humanos como a animales. Los adenovirus de la presente invención incluyen, sin limitación, adenovirus aviar, caninos, equinos,

bovinos, ovinos, porcinos, humanos o de la rana. En una realización preferida los adenovirus de la invención son adenovirus humanos.

- Por “adenovirus quiméricos”, “adenovirus quimera” o “adenovirus híbridos” según se utiliza indistintamente en este documento, se entienden adenovirus formados a partir de la combinación de elementos procedentes de distintos serotipos. En el contexto de la presente invención son adenovirus cuyo genoma codifica para una cápside de un serotipo y fibras de al menos un serotipo distinto al de la cápside. Cada una de las fibras del adenovirus quimera o híbrido puede proceder de un único serotipo *wild-type* o de una variante funcionalmente equivalente que presenta al menos el 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% de similitud o identidad con la secuencia proteica de la fibra del serotipo *wild-type*. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en ordenador y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP (BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J., 1990, Mol. Biol. 215:403-410).
- Dichas variantes funcionalmente equivalentes pueden ser el producto de delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones de aminoácidos. La variante puede consistir en cambios conservativos, en los que se ha sustituido un aminoácido por otro con propiedades estructurales y químicas similares, por ejemplo, el reemplazamiento de leucina por isoleucina; o cambios no conservativos, por ejemplo cuando se reemplaza una glicina por un triptófano.

Otras variantes contempladas en la presente invención son aquellas en las que se ha producido la inserción de una secuencia heteróloga en la cabeza de la fibra (Krasnykh V y cols. J. Virol 1998, 72: 1844-1852).

30

Las fibras de los adenovirus híbridos o adenovirus quimera también pueden ser fibras híbridas o quiméricas, que han sido modificadas incorporando a su extremo C-terminal motivos que facilitan la interacción del adenovirus con la célula huésped (Michael SI y cols. Gene Therapy 1995, 2:660-668; Wickham TJ y cols. J Virol

1997, 71:8221-8229), o eliminando el dominio globular y sustituyéndolo por otras secuencias de unión (según se describe en las solicitudes de patente internacional WO01/81607 y WO01/02431).

- 5 Los adenovirus quimera o adenovirus híbridos contemplados en la invención también pueden incluir fibras quiméricas formadas por segmentos procedentes de diferentes serotipos. Ejemplos de adenovirus con fibras quiméricas procedentes de diferentes serotipos se encuentran, por ejemplo, en la solicitud de patente internacional WO9850053, donde se describen adenovirus recombinantes Ad5 en
10 los que la cabeza de la proteína fibra original ha sido sustituida por la perteneciente a Ad3.

Estos adenovirus quimera o adenovirus híbridos son vectores adenovirales recombinantes que pueden generarse por técnicas de biología molecular conocidas
15 en el estado de la técnica (Horwitz MS, "Adenoviruses", en Fields Virology, tercera edición, editado por B.N. Fields y cols., Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, Pa (1996)).

La partícula del adenovirus consiste en una cápside que encapsula la molécula de
20 ADN vírico. El término "cápside" se refiere a la cubierta externa del adenovirus, que está formada por subunidades llamadas capsómeros, que pueden ser hexagonales y pentagonales. La mayor parte de la cápside está constituida por la proteína hexona, y en cada vértice hay un complejo formado por las proteínas base pentona y fibra. El término "fibra", según se utiliza en el presente documento, se
25 refiere a la proteína fibra asociada a cada base pentona de la cápside del adenovirus, y cuya función es facilitar la unión del adenovirus a la superficie de la célula que infecta (Philipson y cols. J Virol 1968, 2:1064-1075). Las fibras de adenovirus son proteínas triméricas que consisten en un dominio globular C-terminal o cabeza, que contiene la putativa región de unión al receptor celular; un eje fibroso central; y una
30 parte N-terminal o cola, que se une a la cápside viral. En presencia del dominio C-terminal globular, que es necesario para la correcta trimerización, el segmento central adopta una conformación beta-espiral triple. Las proteínas de la fibra se incorporan como trímeros en la estructura de la cápside, constituyendo proyecciones

delgadas que parten de los vértices del icosaedro. Hay 12 homotrímeros de fibra por cada partícula viral.

El término “adenovirus híbrido mosaico” o “adenovirus quimera mosaico” según se utiliza en el presente documento se refiere a “adenovirus quimeras” o “adenovirus híbridos” que comprenden una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus y donde las fibras del primer tipo de adenovirus no han sido codificadas por el genoma de dicho adenovirus, sino que han sido proporcionadas in trans por las células en las que se ha propagado. Por “primer tipo de adenovirus” y “segundo tipo de adenovirus” se entiende un primer y un segundo serotipo de adenovirus, que deben ser distintos entre sí y pueden seleccionarse de cualquiera de los serotipos de adenovirus conocidos. Por “fibras de al menos un segundo tipo de adenovirus” se entiende que dichas fibras pueden ser fibras formadas íntegramente por un segundo tipo de adenovirus o bien fibras quimeras, formadas por fragmentos de un segundo tipo de adenovirus y fragmentos de uno o más tipos diferentes de este segundo tipo. Además, el adenovirus híbrido mosaico de la invención podrá incluir fibras de tipos de adenovirus adicionales.

Según la presente invención se entiende por “serotipo” cada uno de los tipos de adenovirus inmunitariamente distintos. Existen 51 serotipos de adenovirus humanos distintos procedentes de 6 subgrupos (subgrupos A a F). La invención contempla el uso de cualquier serotipo adenoviral conocido en el estado de la técnica incluyendo, sin ninguna limitación, cualquiera de los serotipos definidos en la tabla 1.

25

30

Tabla 1: Algunos ejemplos de subgrupos y serotipos adenovirales adecuados para su uso en la presente invención.

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

5

En una realización preferida de la invención el primer y el segundo tipo de adenovirus de la cápside y las fibras del adenovirus híbrido mosaico proceden de diferentes subgrupos.

- 10 En otra realización particular el primer tipo de adenovirus pertenece al subgrupo C y/o el segundo tipo de adenovirus pertenece al subgrupo F.

La expresión “adenovirus del subgrupo C”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de adenovirus que produce infecciones del tracto respiratorio y que incluye los serotipos 1, 2, 5 y 6. Cada uno de estos serotipos posee un único tipo de proteína fibra. La invención puede llevarse a cabo con un adenovirus híbrido que contenga elementos de cualquier serotipo del subgrupo C conocido en el estado de la técnica.

- 20 De los distintos serotipos capaces de infectar a seres humanos, el más utilizado en los ensayos de terapia génica es el serotipo 5 (Ad5), que está asociado principalmente con infecciones respiratorias suaves, cuya secuencia genómica está disponible en la base de datos de GenBank con el código AC-000008 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=23238>). Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el adenovirus híbrido posee el genoma y la cápside del adenovirus de serotipo 5 (Ad5).

La expresión “adenovirus del subgrupo F”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de virus conocido como adenovirus entéricos, que incluye a los serotipos 40 y 41, caracterizado porque, a diferencia de otros
5 adenovirus, la entrada en la célula a infectar no depende de la interacción entre los motivos RGD de la base pentona del adenovirus y el receptor de integrinas de la superficie de la célula. En su lugar, los adenovirus del subgrupo F pueden usar un mecanismo alternativo para facilitar la endocitosis. En contraste con el resto de especies de adenovirus humanos, los adenovirus entéricos también se caracterizan
10 porque poseen dos proteínas fibra diferentes, que se encuentran en cada virión en aproximadamente el mismo número. Concretamente, poseen una fibra larga, que se une al receptor CAR y, adicionalmente, una fibra corta que no se une a CAR, y que tiene una función desconocida. Otras características de los adenovirus entéricos son el punto isoeléctrico relativamente elevado de sus proteínas estructurales, el
15 aumento de su viabilidad después de la exposición a un entorno ácido (como sucede en algunas partes del tracto gastrointestinal), y su habilidad para unirse a ciertos lípidos de la mucosa gástrica, especialmente después de la exposición a pH bajos. La invención puede llevarse a cabo usando cualquier adenovirus del subgrupo F conocido en el estado de la técnica, y más particularmente la proteína de la fibra
20 corta de los serotipos Ad40 (SEQ ID NO: 1) o del Ad41 (SEQ ID NO: 2). En una realización preferida el adenovirus híbrido posee la proteína de la fibra corta del Ad40.

Así, en una realización particular de la invención el adenovirus que pertenece al
25 subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40.

En otra realización todavía más particular, el adenovirus híbrido es un adenovirus conocido como Ad5/40, preferiblemente Ad5/40S. En el contexto de la presente
30 invención el adenovirus Ad5/40S es un adenovirus híbrido que se obtiene al reemplazar la proteína de la fibra del Ad5 completa por la fibra corta completa del Ad40.

El método de la invención permite obtener adenovirus híbrido mosaico mediante la infección de células permisivas con adenovirus híbridos y su posterior cultivo.

La primera etapa del método consiste en infectar células permisivas que expresan la
5 fibra de un tipo de adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de un tipo de adenovirus y fibras de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus cuya fibra se expresa en las células permisivas.

Por “infección” o “infectar”, en el contexto de la presente invención, se entiende el
10 procedimiento por el cual los adenovirus penetran en las células. Dicha infección puede ser más o menos rápida y depende del tipo de crecimiento celular o de la expresión de los receptores que usan los adenovirus para internalizarse.

La entrada del adenovirus en la célula implica tres tipos de interacciones. La
15 primera interacción se produce cuando la protuberancia o cabeza de la proteína fibra del adenovirus se une específicamente a un receptor de la superficie celular. Los dos receptores actualmente conocidos son el receptor CD46 para los serotipos de adenovirus humano del grupo B y el receptor coxsackie adenovirus (CAR) para los demás serotipos. A continuación se produce la interacción secundaria, en la cual la
20 proteína de la base pentona viral interactúa con una molécula de integrina alfaV de la célula. Un tercer lugar de unión a receptor se localiza en la tercera repetición beta-espiral del cuerpo de la fibra que se une a glicosaminoglicano heparan sulfato. Estas interacciones estimulan la señalización celular e inducen la polimerización de actina dando lugar a la introducción del virión en la célula huésped a través de un
25 endosoma.

Por tanto, es la fibra, principalmente, la que define los tipos celulares que cada adenovirus es capaz de infectar, que serán aquellos que posean los receptores adecuados para que la fibra del adenovirus interaccione con ellos.

30

La infección se realiza poniendo en contacto el adenovirus híbrido y la célula permisiva durante un tiempo determinado por cualquier método conocido en el estado de la técnica.

Por “células permisivas” se entienden células que expresan en su superficie los receptores y co-receptores necesarios para permitir el reconocimiento e infección de un virus dado, pero que además poseen toda la maquinaria metabólica que el virus necesita para replicarse y carecen de factores que inhiban la replicación de dicho

5 adenovirus. Es decir, una célula permisiva para los adenovirus de la invención es cualquier célula capaz de ser infectada por dichos adenovirus y de permitir que dichos adenovirus se repliquen. En el contexto de la presente invención las células permisivas deben, además, expresar la fibra de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus de la fibra del adenovirus híbrido con el que se van a infectar dichas

10 células, y también deben ser capaces de crecer en suspensión. Pueden utilizarse líneas celulares comerciales o conocidas que expresan la fibra de un adenovirus, o bien dichas líneas pueden generarse en el laboratorio por métodos conocidos en el estado de la técnica, como se detalla, por ejemplo en Von Seggern (Von Seggern DJ y cols. J Gen Virol 1998, 79: 1461-1468). Las células permisivas de la invención se

15 elegirán en función del serotipo del adenovirus híbrido con el que se pretende infectar y se seleccionan, sin limitación, de células permisivas que expresan la fibra de un adenovirus de cualquier serotipo conocido desde el 1 al 51. Preferiblemente, en una realización de la invención dichas células permisivas son células que expresan la fibra del adenovirus Ad5. Ejemplos de líneas celulares conocidas que

20 expresan la proteína de la fibra del Ad5 son la línea 211B, 211A y 211R (Von Seggern DJ y cols. J Gen Virol 1998, 79:1461-1468; la patente estadounidense US 7,232,899 B2), las líneas 601 y 633 (Von Seggern DJ y cols. J Virol 2000, 74:354-362). Sin embargo, todas estas líneas celulares crecen en adherencia, y un requisito indispensable en el método de la invención es que la línea celular permisiva debe

25 crecer en suspensión. Por ello, los inventores han adaptado la línea celular 211B al crecimiento en suspensión, obteniendo una nueva línea celular a la que han denominado 211BS. La caracterización de esta línea celular ha demostrado que su viabilidad se mantiene a lo largo de los días, incluso en concentraciones celulares elevadas, su crecimiento es eficiente y su tiempo de duplicación es de 2,1 días.

30

El adenovirus con el que se infectan las células permisivas comprende la cápside de un tipo de adenovirus y fibras de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus cuya fibra se expresa en las células permisivas. En una realización particular, los adenovirus que pueden utilizarse para infectar son adenovirus Ad5

modificados en los que la proteína fibra ha sido reemplazada total o parcialmente por la fibra de otro serotipo, seleccionados de Ad5.Fib1, Ad5.Fib2, Ad5.Fib3, Ad5.Fib4, Ad5.Fib6, Ad5.Fib7, Ad5.Fib8, Ad5.Fib9, Ad5.Fib10, Ad5.Fib11, Ad5.Fib12, Ad5.Fib13, Ad5.Fib14, Ad5.Fib15, Ad5.Fib16, Ad5.Fib17, Ad5.Fib18, Ad5.Fib19, Ad5.Fib20, Ad5.Fib21, Ad5.Fib22, Ad5.Fib23, Ad5.Fib24, Ad5.Fib25, Ad5.Fib26, Ad5.Fib27, Ad5.Fib28, Ad5.Fib29, Ad5.Fib30, Ad5.Fib31, Ad5.Fib32, Ad5.Fib33, Ad5.Fib34, Ad5.Fib35, Ad5.Fib36, Ad5.Fib37, Ad5.Fib38, Ad5.Fib39, Ad5.Fib40-L, Ad5.Fib40-S, Ad5.Fib41-L, Ad5.Fib41-S, Ad5.Fib42, Ad5.Fib43, Ad5.Fib44, Ad5.Fib45, Ad5.Fib46, Ad5.Fib47, Ad5.Fib48, Ad5.Fib49, Ad5.Fib50, Ad5.Fib51. Ejemplos de estos adenovirus híbridos se describen en las solicitudes de patente internacional WO0304661 y WO0227006. En una realización particular los adenovirus híbridos son adenovirus Ad5 en los que la fibra ha sido sustituida por la fibra corta o larga de Ad40 o Ad41, seleccionados de Ad5.Fib40-S, Ad5.Fib40-L, Ad5.Fib41-S y Ad5.Fib41-L, donde S y L hacen referencia a la fibra corta y larga, respectivamente. En una realización particular de la invención los adenovirus con los que se infectan las células permisivas son adenovirus Ad5/40S que tienen la cápside del Ad5 y la fibra corta del Ad40.

Posteriormente, las células obtenidas en la etapa (i) se cultivan en condiciones que permiten la amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo de replicación del adenovirus y de la célula permisiva.

Por “cultivar las células obtenidas en la etapa (i)” se entiende la propagación de las células infectadas con el adenovirus híbrido en un medio de crecimiento apropiado y en unas condiciones de temperatura y mezcla de gases adecuados. Las condiciones de cultivo varían ampliamente dependiendo del tipo celular, pero en el contexto de esta invención el cultivo de las células se realiza siempre en suspensión. La composición del medio de crecimiento varía en cuanto a concentración de glucosa, factores de crecimiento y otros componentes nutritivos, y también varía el pH. El medio de crecimiento se seleccionará en función de la línea celular y contendrá soluciones salinas equilibradas, aminoácidos, vitaminas, otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular, y, opcionalmente, hormonas y factores de crecimiento (suero) e inhibidores del crecimiento de los contaminantes (como antibióticos y antifúngicos). Se utilizarán medios de cultivo aptos para el

cultivo en suspensión. Ejemplos de medios de crecimiento que pueden utilizarse para el cultivo de células en suspensión son medios libres de suero como SFMII no suplementado o suplementado con pequeñas cantidades de suero, más concretamente es medio SFMII suplementado con 0,5% de suero bovino fetal.

5

Por “amplificación del adenovirus” se entiende el aumento del número de copias del adenovirus. Esta amplificación se realiza al menos durante un ciclo de replicación del adenovirus. Por “ciclo de replicación del adenovirus” o “ciclo de replicación adenoviral” se entiende, en el contexto de esta invención, el conjunto de procesos por los cuales el adenovirus reconoce una célula, entra en ella, libera su genoma, se replica y arma partículas virales progenie que permanecen en las células hasta que estas son lisadas para su recogida.

El ciclo de replicación del adenovirus consta de diferentes etapas: unión a la célula, que como se ha explicado anteriormente se realiza a través de la interacción de la proteína fibra con los receptores celulares; internalización, que implica la interacción de la pentona con las integrinas V3 y V5; la penetración, que se produce por endocitosis en vesículas revestidas de clatrina, de manera que posteriormente la vesícula se rompe produciéndose la liberación de la partícula viral dentro del citoplasma, con pérdida de proteínas de la cápside y denudamiento del ADN viral; migración, cuando el núcleo de la partícula viral restante migra desde el citoplasma al núcleo vía microtúbulos y el ADN viral entra al núcleo a través de los poros nucleares; la replicación del ADN, que tiene lugar en el núcleo, después de que el ADN viral sea convertido en un complejo histonas celulares-ADN viral; y finalmente, ensamblaje del virión, que empieza en el citoplasma, donde polipéptidos individuales se ensamblan en capsómeros (hexones y pentonas), y posteriormente estas cápsides inmaduras y vacías son ensambladas en el núcleo celular, estando el núcleo de la partícula viral formado por ADN genómico y proteínas asociadas. En el contexto de esta invención, el ciclo de replicación del adenovirus termina justo antes de que las nuevas partículas adenovirales lisen la célula y se liberen al exterior.

Los términos “partícula viral”, “partícula vírica” o “virión” se utilizan de manera intercambiable a lo largo de la memoria para referirse a partículas adenovirales

infecciosas formadas cuando un vector adenoviral que contiene toda o una parte de un genoma viral infecta una línea celular apropiada para la generación de dichas partículas.

- 5 Por “ciclo de replicación de la célula permisiva” se entiende el conjunto de procesos por el que una célula madre se divide para formar dos células hijas que mantienen la capacidad de la célula madre de permitir la replicación del adenovirus.

La siguiente etapa del método de la invención (etapa iii) consiste en recuperar las
10 partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las células obtenidas en la etapa (ii).

Tras la síntesis y ensamblaje de la cápside las partículas virales obtenidas serán adenovirus híbrido mosaico, según se ha definido anteriormente. Estos adenovirus
15 híbrido mosaico poseen fibras de dos orígenes diferentes: las que proceden del genoma del adenovirus híbrido con el que se ha infectado la línea celular en la etapa (i), y las que proceden de la línea celular permisiva.

Por “recuperar las partículas virales” se entiende el procedimiento por el cual se
20 lisan física o químicamente las células antes de que se produzca la lisis natural por parte de las nuevas partículas adenovirales generadas en el ciclo de replicación, con la finalidad de recoger dichas partículas cuando se hallan concentradas en el núcleo, lo que facilita una posterior purificación. La lisis de dichas células y recolección de las partículas virales se efectúa por métodos conocidos por el experto en la técnica,
25 por ejemplo por ciclos de congelación y descongelación,

Una vez recuperadas las partículas virales existe una etapa opcional (etapa iv) que consiste en repetir las etapas anteriores de manera cíclica con las partículas virales obtenidas en la etapa (iii) que se utilizan para la infección en la etapa (i) del
30 siguiente ciclo de amplificación.

Por “ciclo de amplificación”, en el contexto de la presente invención, se entiende el tiempo transcurrido entre la infección con el adenovirus híbrido y la recogida de las partículas virales de adenovirus híbrido mosaico. El tiempo de un ciclo de

replicación viral completo dependerá del adenovirus híbrido particular y de la línea celular utilizada y en cada caso deberá ser determinado por el experto en la técnica. En una realización particular, cuando el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 5 40, cada ciclo de amplificación tiene una duración de entre 44 y 64 horas, preferiblemente de entre 48 y 56 horas, más preferiblemente de 56 horas.

El método de la invención se caracteriza porque se lleva a cabo en células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión y en donde la etapa (i) se lleva a 10 cabo en presencia de un policationión.

Por “células permisivas adaptadas al crecimiento en suspensión” se entiende que las células son capaces de vivir de forma natural sin adherirse a una superficie. Dichas células pueden pertenecer a líneas celulares conocidas que crezcan habitualmente en 15 suspensión o a líneas celulares adherentes que han sufrido modificaciones que les permiten crecer en suspensión. El uso de cultivos en suspensión tiene como ventaja que permite realizar la amplificación del adenovirus en sistemas escalables, como bioreactores, o bien mediante el aumento de la densidad celular o bien expandiendo el volumen de cultivo.

20

Las células permisivas se coincubaban con un policationión durante la infección para favorecer la entrada del adenovirus en la célula al permitir la interacción entre las cápsides del adenovirus, cargadas negativamente, y las membranas celulares, también cargadas negativamente. En la presente invención se entiende por 25 “policationión” o “polímero catiónico” un oligómero o polímero orgánico de origen natural o sintético, portador de gran cantidad de cargas positivas a pH neutro que es capaz de dirigir la entrada de la partícula adenoviral al interior de las células productoras. Policationes adecuados para el método de la invención son, pero no se limitan a, polietilenimina, protamina, poliarginina, poliornitina, polilisina, polibreno 30 (bromuro de hexadimetrina), sulfato de protamina, hidrobromuro de poli-L-lisina, policloruro de dimetildialilamonio (Merquat®-100, Merquat®-280, Merquat®-550), hidrocloreuro de poli-L-arginina, poli-L-histidina, poli(4-vinilpiridina), hidrocloreuro de poli(4-vinilpiridina), poli(4-vinilpiridina-co-estireno), polivinilpirrolidona, poli-L-lisina succinilada, DEAE-dextrano, espermina,

espermidina, etc. En una realización particular de la invención el polication es polibreno.

Para obtener finalmente partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico, es decir, del adenovirus con el que se ha realizado la infección inicial de las células en la etapa (i), las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico que se han recuperado en la etapa (iii) o bien en la etapa (iv) se someten a una etapa final de amplificación en células que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico.

10

Por “adenovirus híbrido no mosaico”, en el contexto de la presente invención, se entiende el adenovirus original con el que se ha realizado la infección inicial de las células en la etapa (i), y que ha sido definido anteriormente como “adenovirus híbrido”, que comprende la cápside de un tipo de adenovirus y fibras de un tipo de adenovirus distinto al tipo de adenovirus cuya fibra se expresa en las células permisivas.

La expresión “etapa final de amplificación” hace referencia a la amplificación del adenovirus híbrido mosaico obtenido en la etapa (iii) o en la etapa (iv) que tiene lugar en células distintas de las utilizadas en la etapa (i) que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, y que por lo tanto permite obtener partículas virales del adenovirus híbrido original.

Por “células que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus” se entiende cualquier tipo de célula que no exprese ninguna proteína fibra y que posea la maquinaria necesaria para que los adenovirus híbridos mosaico puedan amplificarse. Preferiblemente, dichas células crecen en suspensión. Ejemplos de estas células adaptadas al crecimiento en suspensión son células HEK293S (Brueggemann L.I. y col. J Gen Physiol, 2002, 119: 593-612), células HEK-293.2sus (número ATCC: CRL-1573.3), células 293F (Invitrogen N° Catálogo: R790-07), Per.C6™, preferiblemente células HEK293S, más preferiblemente células 293F.

Por lo tanto, en una realización de la invención, las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico recuperadas en la etapa (iii) o (iv) son sometidas a una etapa final de amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico. En una realización particular las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células HEK293S. En otra realización particular las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células 293F.

10

La etapa final de amplificación en células que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus puede llevarse a cabo tanto en presencia como en ausencia de un polication, pero la presencia de dicho agente facilita la entrada del adenovirus en las células. Por lo tanto, en una realización particular la etapa final de amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus se lleva a cabo en presencia de un polication, más preferiblemente en presencia de polibreno.

Este método permite optimizar el proceso de amplificación y producción de adenovirus híbridos, de modo que se mejora la eficiencia de amplificación, reduciéndose a un tercio el número de ciclos de amplificación necesarios en comparación con protocolos clásicos, y también se reduce el tiempo y el material fungible utilizado, así como el riesgo de formación de partículas competentes en replicación por recombinación con las secuencias E1 de las células permisivas.

25

KITS DE LA INVENCION Y SUS USOS

La invención también proporciona kits para la amplificación de adenovirus híbrido mosaico según el método de la invención.

30

El término “kit”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación de un conjunto de componentes adecuados para amplificar un adenovirus híbrido mosaico según el método de la invención, junto con sus contenedores y envases apropiados para su venta comercial.

En la presente invención, se entiende como “componente adecuado para amplificar un adenovirus híbrido mosaico según el método de la invención”, a cualquier compuesto que pueda usarse en cualquiera de las etapas (i) a (iv) del método de la invención y/o en la etapa de amplificación final, e incluye, sin limitación, medios, aditivos, líneas celulares, policationes, adenovirus híbrido mosaico, etc.

Así, en un aspecto la invención se relaciona con un kit para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico comprendiendo dicho adenovirus una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de al menos dos tipos de adenovirus, siendo uno de los tipos de adenovirus de las fibras del mismo tipo que la cápside, donde dicho kit comprende:

- a) al menos una línea celular permisiva que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus apta para el cultivo en suspensión y
- b) un policación

Los términos “amplificación”, “adenovirus híbrido”, “adenovirus híbrido mosaico”, “cápside”, “fibra”, “tipo de adenovirus”, “línea celular permisiva” y “policación” ya han sido definidos con anterioridad en el contexto de los métodos de la invención.

Dicho kit incluye al menos una línea celular permisiva apta para el cultivo en suspensión que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus y un policación que facilita la infección de las células por parte del adenovirus

En una realización particular dicho kit comprende adicionalmente un adenovirus híbrido o al menos un polinucleótido que permita generar dicho adenovirus. El término “adenovirus híbrido” ya ha sido definido con anterioridad y se refiere al adenovirus híbrido que se pretende amplificar. El término “polinucleótido” indica un nucleótido de forma polimérica de cualquier longitud que contiene todo el material genético necesario que codifica para generar partículas adenovirales completas. Dicho término incluye ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos, ARN de cadena simple y doble, y también polinucleótidos modificados, tales como polinucleótidos metilados.

En otra realización particular dicho kit comprende adicionalmente al menos una línea celular adaptada al crecimiento en suspensión que no expresa la fibra del primer tipo de adenovirus. Dicha expresión tiene el mismo significado que el definido en el contexto de los métodos de la invención.

5

En realizaciones preferidas los kits de la invención pueden utilizarse con cualquiera de los adenovirus híbridos descritos en el contexto del primer aspecto de la invención.

- 10 En una realización preferida de la invención el policondicionamiento que se utiliza en el kit es polibrenio.

Es otro aspecto de la invención el uso de estos kits para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico.

15

EJEMPLOS

Adaptación de las células 211B al cultivo en suspensión

- 20 Puesto que la entrada del Ad5/40S en las células HEK-293 es muy ineficiente, se seleccionó como línea celular productora la línea celular 211B, ya que estas células expresan constitutivamente la proteína fibra F5 del Ad5 (Von Seggern y cols. J Virol 2000, 74:354-62; Von Seggern y cols. J Gen Virol 1998, 79:1461-8). Las células 211B adherentes expresan constitutivamente la proteína adenoviral de la
- 25 fibra 5 en el citoplasma cuando son cultivadas en medio DMEM (Medio de Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS). Para adaptar estas células al crecimiento en suspensión, el medio DMEM 10% FBS se sustituyó a continuación por el SFMII. Posteriormente, las células fueron transferidas a placas de 6 pocillos para suspensión. Algunos pocillos se
- 30 suplementaron con una dosis baja de FBS (1% de FBS o 0,5% de FBS). La adición de 0,5% de FBS permitió un mejor crecimiento y viabilidad en comparación con los pocillos sin FBS; mientras que la adición de 1% de FBS llevó a la formación de grandes agregados celulares. Las nuevas células adaptadas al cultivo en suspensión se denominaron 211BS.

Las células 211BS se transfirieron a frascos en agitación y se mantuvieron en suspensión a una velocidad de 110 rpm y a una densidad de 7×10^5 células/ml. Tras 18 pases seriados, las células adaptadas crecieron aisladas o en pequeños agregados de 4-5 células, y a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/ml las células 211BS mantuvieron una alta viabilidad. Para determinar su curva de crecimiento, las células 211BS se cultivaron por triplicado a diferente densidad. La viabilidad y densidad se evaluó diariamente durante una semana. Como se observa en la Figura 1A la viabilidad de estas células estaba por encima del 80% y se mantuvo constante incluso a una alta densidad celular. Además, el crecimiento celular fue constante y su constante numérica de crecimiento μ fue de 0,3246 (Figura 1B).

El polibreno mejora la infección por el adenovirus quimérico Ad5/40S en células 211BS

Se ensayó si el polibreno era capaz de mejorar la entrada del adenovirus en las células productoras durante las etapas de amplificación. Se infectaron diferentes lotes de células 211BS con MOI crecientes de Ad5/40S-CMV-GFP en ausencia o presencia de polibreno, y el porcentaje de células infectadas se cuantificó mediante la expresión GFP de células tras análisis mediante separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Como se observa en la Figura 2, la transducción de Ad5/40S en células 211BS está significativamente aumentada cuando se co-incuban con polibreno, lo que permite aumentar la eficiencia del protocolo de amplificación.

Estudio del ciclo celular viral de Ad5/40S en células 211BS

Los Ad5/40S quiméricos producidos en células 293S contienen proteína F40S en sus cápsides, mientras que los Ad5/40S producidos en células 211BS se espera que contengan tanto proteínas F5 como F40S, ya que las células 211BS expresan constitutivamente proteína F5 (Fig. 3A). En consecuencia, durante las etapas de amplificación, la producción en células 211BS generará mosaicismo con cápsides que contienen tanto las proteínas F5 como las F40S (Figura 3B). El mosaicismo de fibras mejora la infectividad de los viriones Ad5/40S durante los ciclos de amplificación permitiendo una entrada más eficiente mediada por la interacción

CAR:F5 en las células productoras 211BS. Para generar cápsides quiméricas puras (no mosaicos), la última etapa de amplificación debe realizarse en células HEK-293 adaptadas al crecimiento en suspensión.

- 5 Para determinar el tiempo de recogida óptimo durante el proceso de amplificación, el ciclo celular viral de Ad5/40S mosaico/quimera se estudió en células 293F. Para hacer un análisis más preciso se cuantificó la producción viral cada 4 horas entre 44 y 64 horas de producción. Como se observa en la Figura 4, los vectores quiméricos Ad5/40S tienen un ciclo viral de 48-56 horas, con el pico más alto a las 56 horas.
- 10 Sin embargo, cuando se usan MOI más altas el pico se mueve hacia las 48 horas. Teniendo en cuenta estos resultados, para los siguientes experimentos el tiempo de recogida óptimo se estableció en 56 horas post-infección.

Producción del vector Ad5/40S con protocolo optimizado

15

- Con el fin de desarrollar un protocolo optimizado de producción del vector, $2,5 \times 10^7$ células 211BS (a una densidad de 10^6 células/ml) se infectaron con un MOI=1 de Ad5/40S-CMV-GFP en presencia de polibreno. A las 56 horas después de la infección las células se recogieron y lisaron mediante congelación-descongelación,
- 20 y el lisado crudo se añadió a células 4×10^8 293F. A las 56 horas las células se recogieron y el lisado crudo se almacenó. El sobrenadante se concentró por diafiltración con el sistema Midjet. El sobrenadante concentrado y el lisado crudo se purificaron mediante gradiente doble de cloruro de cesio. Como se muestra en la Figura 5, el nuevo protocolo desarrollado es escalable y tiene sólo dos etapas de
- 25 amplificación, lo que reduce considerablemente no sólo el tiempo y el coste del protocolo, sino también la generación de partículas replicativas competentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de un adenovirus híbrido mosaico que comprende una
5 cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de dicho primer tipo de adenovirus y de al menos un segundo tipo de adenovirus que comprende
 - (i) infectar células permisivas que expresan la fibra de un primer tipo de
10 adenovirus con un adenovirus que comprende la cápside de dicho primer tipo de adenovirus y fibras de un segundo tipo de adenovirus distinto al primer tipo de adenovirus,
 - (ii) cultivar las células obtenidas en la etapa (i) en condiciones que permitan la
amplificación del adenovirus durante al menos un ciclo de replicación del
adenovirus y/o de la célula permisiva,
 - (iii) recuperar las partículas virales del adenovirus híbrido mosaico a partir de las
15 células obtenidas en la etapa (ii) y,
 - (iv) opcionalmente, repetir las etapas (i) a (iii) en donde las partículas virales
obtenidas en la etapa (iii) se utilizan para la infección en la etapa (i) del
siguiente ciclo de amplificación,en donde las células permisivas son células adaptadas al crecimiento en suspensión y en
20 donde la etapa (i) se lleva a cabo en presencia de un policatión.
2. Un método según la reivindicación 1 en el que las partículas virales del adenovirus
híbrido mosaico recuperadas en la etapa (iii) o (iv) son sometidas a una etapa final de
amplificación en células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la
25 fibra del primer tipo de adenovirus, recuperándose partículas virales del adenovirus híbrido no mosaico.
3. Un método según la reivindicación 2 en el que la etapa final de amplificación en células
adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de
30 adenovirus se lleva a cabo en presencia de un policatión.

4. Un método según las reivindicaciones 2 ó 3 donde las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células HEK293S.
- 5 5. Un método según las reivindicaciones 2 ó 3 donde las células adaptadas al crecimiento en suspensión que no expresan la fibra del primer tipo de adenovirus son células 293F.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el policondrol es polibuteno.
- 10 7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el primer tipo de adenovirus pertenece al subgrupo C y/o el segundo tipo de adenovirus pertenece al subgrupo F.
8. Un método según la reivindicación 7 donde el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40.
- 15 9. Un método según la reivindicación 8 en donde cada ciclo de amplificación tiene una duración de entre 44 y 64 horas.
- 20 10. Un método según la reivindicación 9 en donde cada ciclo de amplificación tiene una duración de entre 48 y 56 horas.
11. Un método según la reivindicación 10 en donde cada ciclo de amplificación tiene una duración de 56 horas.
- 25 12. Un kit para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico comprendiendo dicho adenovirus una cápside de un primer tipo de adenovirus y fibras de al menos dos tipos de adenovirus, siendo uno de los tipos de adenovirus de las fibras del mismo tipo que la cápside, donde dicho kit comprende:
 - a) al menos una línea celular permisiva que expresa la fibra del primer tipo de adenovirus apta para el cultivo en suspensión y
- 30

b) un policación

13. Un kit según la reivindicación 12 que adicionalmente comprende un adenovirus híbrido o al menos un polinucleótido que permita generar dicho adenovirus.

5

14. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13 que adicionalmente comprende al menos una línea celular adaptada al crecimiento en suspensión que no expresa la fibra del primer tipo de adenovirus.

- 10 15. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 donde el policación es polibreno.

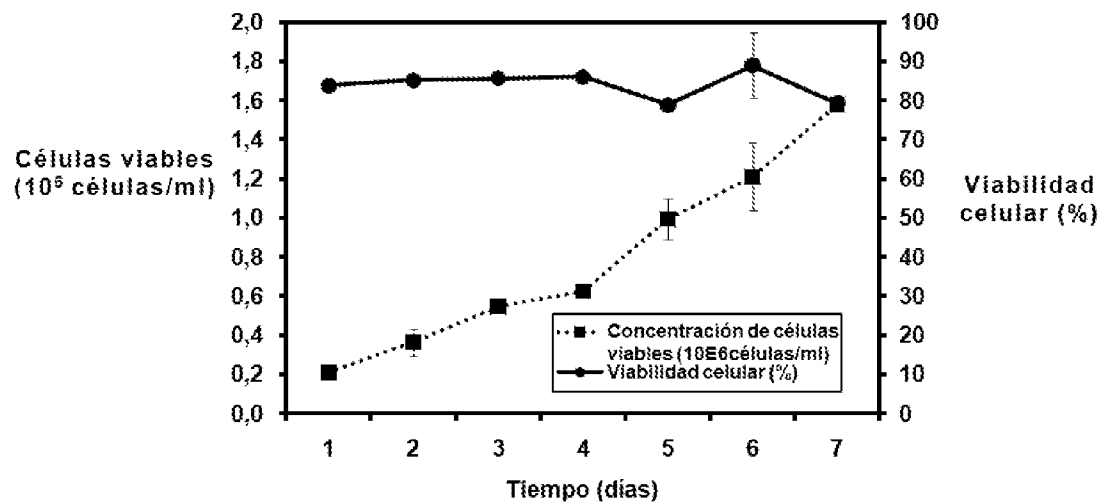
16. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 donde el primer tipo de adenovirus pertenece al subgrupo C y/o el segundo tipo de adenovirus pertenece al subgrupo F.

15

17. Un kit según la reivindicación 16 donde el adenovirus que pertenece al subgrupo C es adenovirus tipo 5 y/o el adenovirus que pertenece al subgrupo F es adenovirus tipo 40.

18. Uso de un kit según las reivindicaciones 12 a 17 para la amplificación de un adenovirus híbrido mosaico.
- 20

A)



B)

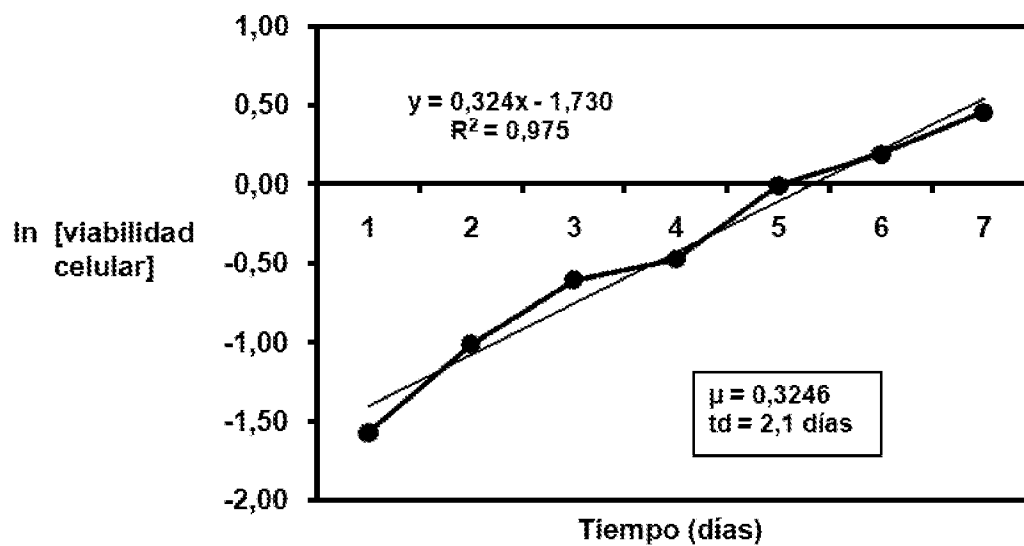


FIG. 1

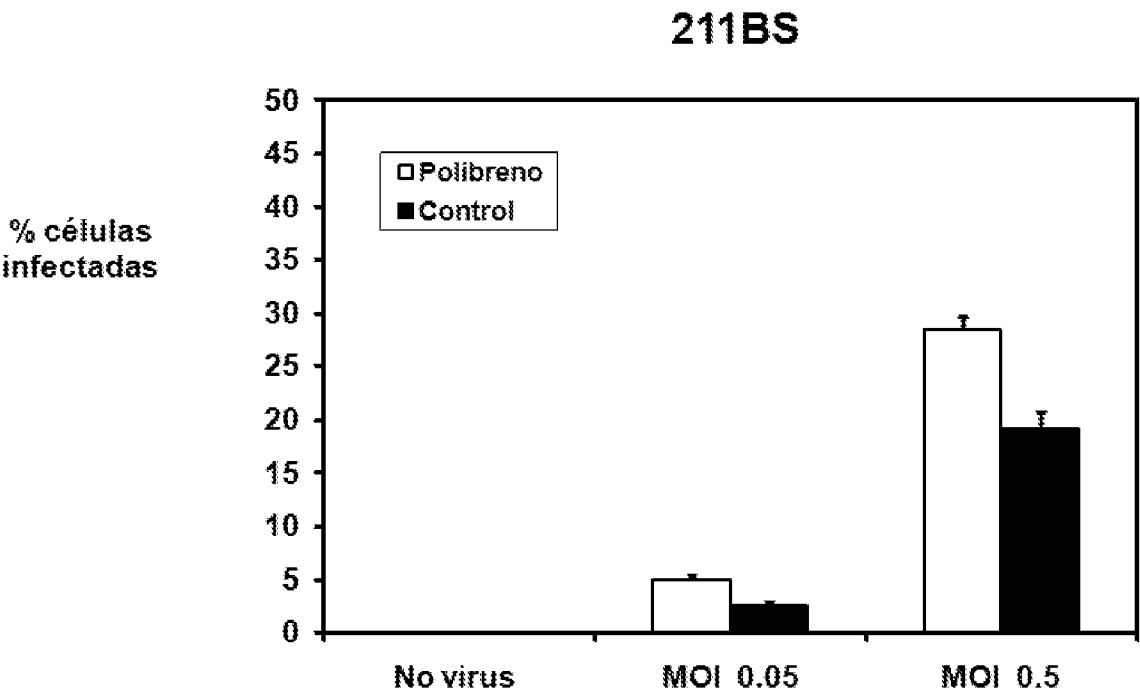
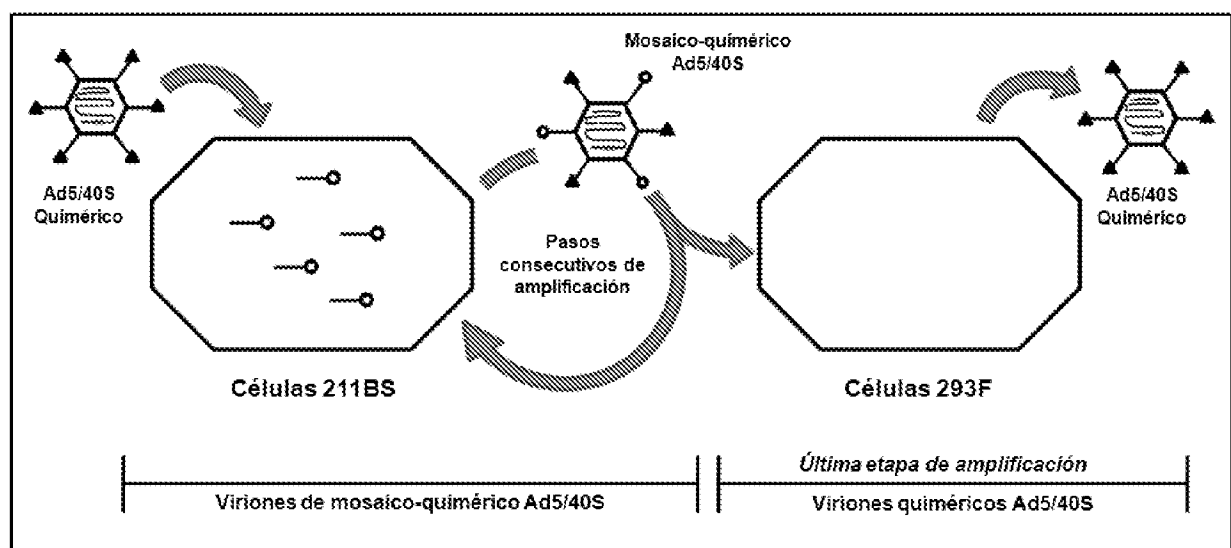


FIG. 2

3/5

A)



B)

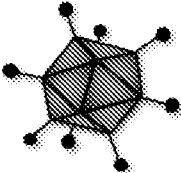
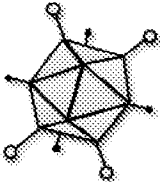
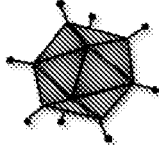
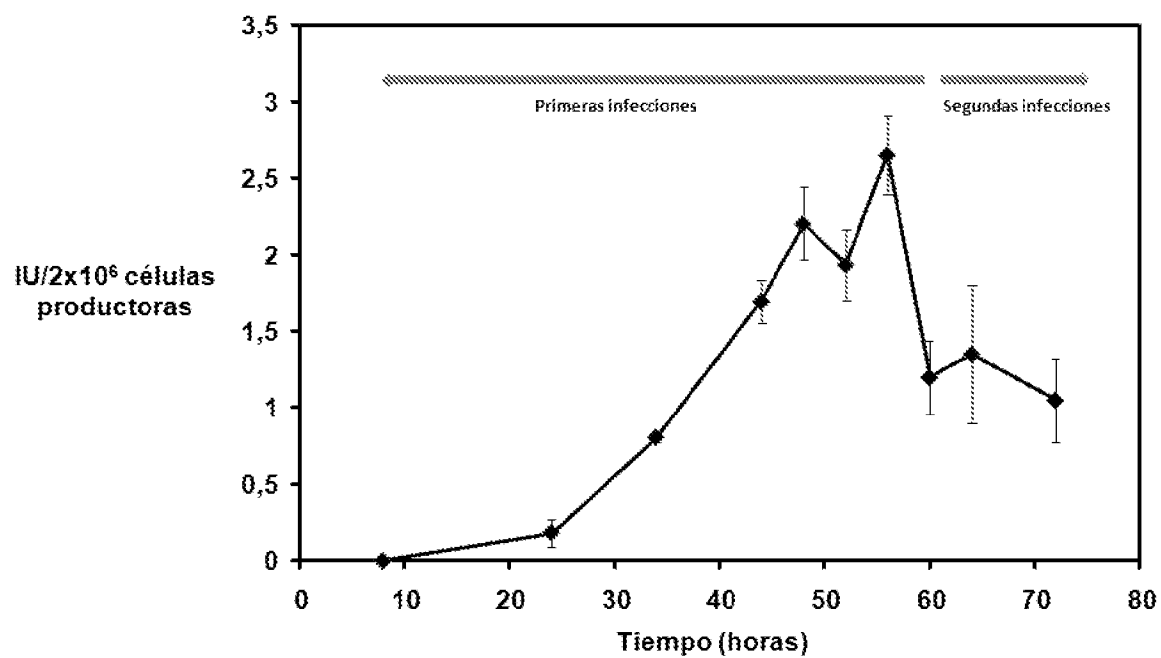
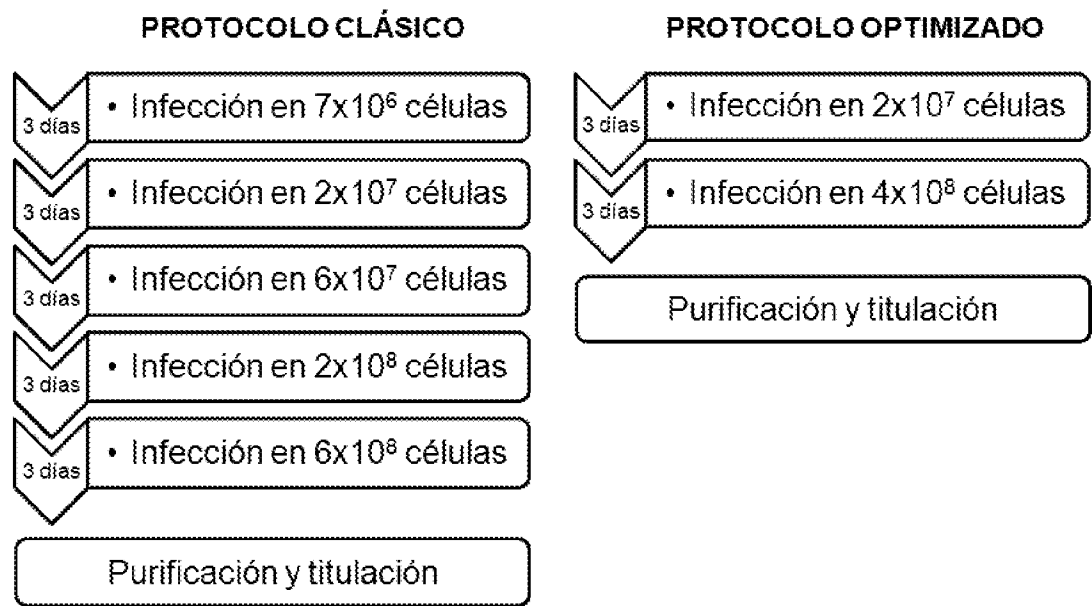
Ad5	Ad40	Ad5/40S Quimérico	Mosaico-Quimérico Ad5/40S
Producción eficiente	Producción extremadamente ineficiente	Producción posible pero ineficiente	Producción optimizada
Tropismo amplio	Tropismo entérico	Tropismo entérico	N.T. (tropismo entérico esperado)
			

FIG. 3

4/5

**FIG. 4**

A)



B)

	Protocolo clásico	Protocolo optimizado
Tiempo en obtener virus producido	15 días	6 días
Material necesario	45 placas de cultivo	3 matraces de agitación
Medio necesario para crecimiento	800 mL	425 mL
Titulación (en células 293)	1 - 5 x 10 ⁹ IU/mL	
PP (ratio 1/100)	1 - 6 x 10 ¹¹ pp/mL	

FIG. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N7/02 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MERCIER, G. T., CAMPBELL, J. A., CHAPPELL, J. D. et al. A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein $\sigma 1$ targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. April 2004, Vol. 101, N° 16, pages 6188-6193. ISSN 0027-8424. <Doi:10.1073/pnas.0400542101>	1-3, 6-11
A	NICOL, C. G., GRAHAM, D., MILLER, W. H. et al. Effect of adenovirus serotype 5 fiber and penton modifications on <i>in vivo</i> tropism in rats. Molecular Therapy. August 2004, Vol. 10, N° 2, pages 344-354. ISSN 1525-0016. <Doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.020>	1, 2, 7-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11/04/2012

Date of mailing of the international search report
(25/04/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
E. Relaño Reyes

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070897

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KRASNYKH, V., BELOUSOVA, N., KOROKHOV, N. et al. Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. Journal of Virology. May 2001, Vol. 75, N° 9, pages 4176-4183. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.75.9.4176-4183.2001>	1, 2, 7-11
A	SHAYAKHMETOV, D. M., LIEBER, A. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. Journal of Virology. November 2000, Vol. 74, N° 22, pages 10274-10286. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.74.22.10274-10286.2000>	1, 3, 6-8
A	CLARK, P. R., STOPECK, A. T., BRAILEY, J. L. et al. Polycations and cationic lipids enhance adenovirus transduction and transgene expression in tumor cells. Cancer Gene Therapy. September-October 1999, Vol. 6, N° 5, pages 437-446. ISSN 0929-1903. <Doi:10.1038/sj.cgt.7700074>	1, 3, 6-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070897

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N7/02 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	MERCIER, G. T., CAMPBELL, J. A., CHAPPELL, J. D. et al. A chimeric adenovirus vector encoding reovirus attachment protein $\sigma 1$ targets cells expressing junctional adhesion molecule 1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Abril 2004, Vol. 101, Nº 16, páginas 6188-6193. ISSN 0027-8424. <Doi:10.1073/pnas.0400542101>	1-3, 6-11
A	NICOL, C. G., GRAHAM, D., MILLER, W. H. et al. Effect of adenovirus serotype 5 fiber and penton modifications on <i>in vivo</i> tropism in rats. Molecular Therapy. Agosto 2004, Vol. 10, Nº 2, páginas 344-354. ISSN 1525-0016. <Doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.020>	1, 2, 7-11

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
11/04/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
25 de abril de 2012 (25/04/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes
Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070897

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	KRASNYKH, V., BELOUSOVA, N., KOROKHOV, N. et al. Genetic targeting of an adenovirus vector via replacement of the fiber protein with the phage T4 fibritin. Journal of Virology. Mayo 2001, Vol. 75, N° 9, páginas 4176-4183. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.75.9.4176-4183.2001>	1, 2, 7-11
A	SHAYAKHMETOV, D. M., LIEBER, A. Dependence of adenovirus infectivity on length of the fiber shaft domain. Journal of Virology. Noviembre 2000, Vol. 74, N° 22, páginas 10274-10286. ISSN 0022-538X. <Doi:10.1128/JVI.74.22.10274-10286.2000>	1, 3, 6-8
A	CLARK, P. R., STOPECK, A. T., BRAILEY, J. L. et al. Polycations and cationic lipids enhance adenovirus transduction and transgene expression in tumor cells. Cancer Gene Therapy. Septiembre-octubre 1999, Vol. 6, N° 5, páginas 437-446. ISSN 0929-1903. <Doi:10.1038/sj.cgt.7700074>	1, 3, 6-8

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070897

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones n°s: **12-18**
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

El objeto de las reivindicaciones de la 12 a la 18, no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT, hasta tal extremo que una búsqueda significativa basada en esas reivindicaciones, resulta imposible por las siguientes razones: no se define de manera clara ninguno de los componentes del kit.

3. ☐ Las reivindicaciones n°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.