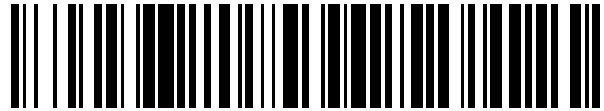


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 504**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013 E 13708445 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2825640**

54 Título: **Lotes de adenovirus recombinantes con extremos alterados**

30 Prioridad:

12.03.2012 US 201261609678 P

12.03.2012 EP 12159009

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

13.09.2016

73 Titular/es:

CRUCCELL HOLLAND B.V. (100.0%)

**Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**CUSTERS, JERÔME H.H.V. y
VELLINGA, JORT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 582 504 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

Lotes de adenovirus recombinantes con extremos alterados

- 5 La invención se relaciona con el campo de la medicina y con el campo de la administración de genes para aplicaciones en la vacunación y en la terapia génica. Más particularmente, la invención se relaciona con lotes de vectores que están basados en adenovirus recombinantes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los adenovirus humanos y animales recombinantes se usan extensamente en aplicaciones relacionadas con la terapia génica y con la vacunación. El vector basado en adenovirus se emplea como vehículo para el gen de interés que se desea introducir en las células huésped, para expresar un gen o parte de éste que codifica un por ejemplo, antígeno deseado para provocar una respuesta inmune.

- 15 Se han identificado adenovirus humanos de más de 50 serotipos diferentes. De ellos, los adenovirus del serotipo 5 (Ad5) han sido los más estudiados históricamente como vehículos para los genes. Recientemente, se han estudiado adenovirus de otros serotipos, tales como los serotipos humanos Ad11, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 o Ad50 o diversos serotipos de simio, para usarlos como vectores, debido a que en las poblaciones humanas hay niveles preexistentes bajos de anticuerpos neutralizadores contra ellos (véase, por ejemplo, WO 00/70071). Algunos ejemplos prometedores de estos adenovirus incluyen los adenovirus recombinantes Ad35 (rAd35) y rAd26, que han sido estudiados en diversos análisis clínicos.

- 25 La biología molecular de los adenovirus, que comprenden un genoma basado en ADN de cadena doble que tiene un tamaño aproximado de 34-38 kb, ha sido estudiada en detalle. Todos los adenovirus se caracterizan por diversas repeticiones terminales invertidas (ITR), que tienen un tamaño aproximado de 100 bp (Dan et al., 2001, Virus Genes, 22: 175-179; Liu et al., 2003, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 272: 131-164) y que se encuentran conservadas entre los serotipos de los diversos grupos (Shinagawa et al., 1987, Gene, 55: 85-93). El extremo 5' del genoma se une a través de enlaces covalentes a una proteína terminal (TP). Las ITR comprenden el origen de replicación (Bernstein et al., 1986, Mol. Cell Biol., 6: 2115-2124; Challberg y Rawlins, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 100-104; Guggenheimer et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3069-3073; Harris y Hay, 1988, J. Mol. Biol., 201: 57-67; Hay, 1985, EMBO J., 4: 421-426, van Bergen et al., 1983, Nucleic Acids Res., 11: 1975-1989; Wang y Pearson, 1985, Nucleic Acids Res., 13: 5173-5187) y son cruciales para la replicación del ADN, ya que también comprenden sitios para que puedan unirse las proteínas celulares que promueven la replicación y que facilitan la formación de los husos. Las secuencias de las ITR comprenden una "región principal" corta canónica, que se encuentra altamente conservada, que se extiende entre los nucleótidos 9 y 18 (Liu et al., supra). Sin embargo, los 8 nucleótidos terminales que preceden la región principal varían entre los diversos tipos y aislados de adenovirus (Alestrom et al., 1982, Gene, 18: 193-197; Dan et al., supra, Jacobs et al., 2004, J. Gen. Virol., 85: 3361-3366; Purkayastha et al., 2005, J. Clin. Microbiol., 43: 3083-3094; Rademaker et al., 2006, J. Gen. Virol., 87: 553-562; Shinagawa et al., 1987, supra; Shinagawa et al., 1983, Virology, 125: 491-495; Shinagawa y Padmanabhan, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3831-3835; Tokunaga et al., 1982, Gene, 18: 329-334; Houng et al., 2006, J. Clin. Virol., 35: 381-387). Si bien los 8 nucleótidos terminales de la mayoría de los adenovirus son CATCATCA, se han descrito diversas secuencias alternativas.

- 45 La demanda de adenovirus recombinantes se ha incrementado notablemente a causa de las diversas enfermedades que podrían ser tratadas o prevenidas mediante el uso de vehículos apropiados para transferir genes, en combinación con la gran cantidad de personas que se ven afectadas por estas enfermedades y el crecimiento constante de la población mundial.

- 50 En el contexto de los lotes clínicos que han de ser administrados en los seres humanos, la producción a gran escala de los adenovirus recombinantes (rAd) debe ser segura y eficaz y debe ser acorde con los lineamientos de las buenas prácticas de manufactura (GMP). En este contexto, un aspecto importante es asegurar la homogeneidad de los lotes de rAd que se produzcan.

- 55 En la presente se indica que, sorprendentemente, se descubrieron cambios en la secuencia de las ocho bases que se hallan más cercanas al extremo 5' de determinados rAd, lo que podría dar como resultado lotes con secuencias heterogéneas.

- 60 De esta manera, existe la necesidad de proveer lotes de rAd a gran escala que presenten una homogeneidad superior. En la presente invención se proveen lotes de este tipo y métodos para elaborarlos. Además, los rAd en los lotes de acuerdo con la presente invención se caracterizan por una replicación superior en los procesos de elaboración.

RESUMEN DE LA INVENCION

En la invención se provee una composición que comprende una pluralidad de partículas de adenovirus recombinantes, donde los adenovirus recombinantes son adenovirus humanos recombinantes de los serotipos 5, 11a, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50 o adenovirus de simio recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas de los adenovirus en dicha composición comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.

En la invención también se provee un método para preparar un lote de (preferiblemente al menos 1×10^7) partículas de adenovirus recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas comprenden secuencias de nucleótidos idénticas en el extremo 5', que comprende a) poner en práctica un paso de clonación molecular para cambiar los extremos 5' de origen natural de los genomas de los adenovirus por extremos 5' alterados, que como nucleótidos terminales comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT; b) propagar los adenovirus recombinantes que comprenden los extremos 5' alterados en células huésped; y c) cosechar los adenovirus recombinantes para obtener un lote de partículas de adenovirus recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.

En la invención también se provee un método para preparar un lote de partículas de adenovirus recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas comprenden secuencias de nucleótidos idénticas en los extremos 5', que comprende a) poner en práctica un procedimiento para purificar los adenovirus en placas, donde los adenovirus recombinantes son adenovirus humanos recombinantes de los serotipos 5, 11a, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50 o adenovirus de simio recombinantes, de manera tal de aislar los adenovirus o adenovirus recombinantes, a partir de una única placa, donde dichos adenovirus o dichos adenovirus recombinantes comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5' de sus genomas; b) propagar los adenovirus recombinantes que se obtuvieron a partir de una única placa en el paso a) en células huésped; y c) cosechar los adenovirus recombinantes para obtener un lote de partículas de adenovirus recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.

En determinados aspectos, los adenovirus recombinantes en las composiciones o los métodos son adenovirus humanos recombinantes, y preferiblemente no son adenovirus humanos de los serotipos 3, 4, 7, 8, 9, 11p, 15, 21, 29, 37 ó 53. En determinadas formas de realización, los adenovirus recombinantes en las composiciones o los métodos de acuerdo con la invención son adenovirus humanos recombinantes de los serotipos 5, 26, 35, 49 ó 50 como se definen en la reivindicaciones. Preferiblemente, los adenovirus recombinantes son adenovirus humanos recombinantes de los serotipos 26 ó 35.

Los adenovirus recombinantes carecen de al menos una porción de la región E1.

En determinadas formas de realización, los adenovirus recombinantes comprenden un transgén.

En determinadas formas de realización, la composición o el lote de adenovirus recombinantes comprenden al menos 1×10^7 , preferiblemente al menos 1×10^8 , preferiblemente al menos 1×10^9 , y preferiblemente al menos 1×10^{10} partículas de adenovirus recombinantes.

En determinadas formas de realización, el paso b) de los métodos de acuerdo con la invención se lleva a cabo en un biorreactor, que preferiblemente tiene un volumen de entre aproximadamente 2 litros y 20000 litros.

En determinadas formas de realización, los métodos de acuerdo con la invención también comprenden purificar los adenovirus recombinantes.

En determinadas formas de realización de las composiciones o los métodos de acuerdo con la invención, los adenovirus recombinantes se formulan en una composición farmacéutica.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

Figura 1. Emergencia de secuencias de ITR alternativas. Los detalles pueden hallarse en el ejemplo 3.

Figura 2. Cinética de la replicación de vectores Ad35 y Ad5 con secuencias de ITR alternativas u originales. Los detalles pueden hallarse en el ejemplo 5.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente se describe que, después de varios pasajes, sorprendentemente se descubrió una secuencia específica en el extremo 5' (CTATCTAT) de diversos adenovirus recombinantes que inicialmente contenían otras secuencias terminales, y que la presencia de esta secuencia puede dar como resultado un incremento en la cantidad de adenovirus producidos.

Los inventores aprovecharon esta observación y concibieron y/o implementaron un paso de selección activa, cuyo propósito fue obtener adenovirus recombinantes con genomas que comprendieran la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5', a partir de adenovirus de serotipos de los que se había informado que comprendían una secuencia terminal diferente en sus genomas salvajes.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con una secuencia particular (CTATCTAT), que puede estar presente en un extremo del genoma de un adenovirus recombinante, y con su uso en la producción de adenovirus recombinantes. Esta secuencia terminal puede emplearse en adenovirus de cualquier serotipo que no comprendan esta secuencia en el extremo 5' de su genoma salvaje.

En principio, las composiciones (los lotes) de adenovirus de acuerdo con la invención pueden contener la secuencia CTATCTAT en 100% de los extremos 5' de su genoma (debido a que los adenovirus iniciales han sido creados y/o seleccionados de manera activa de acuerdo con la invención). A causa de las mutaciones naturales que pueden aparecer ocasionalmente y al azar en cualquier sistema biológico, la cantidad real puede ser ligeramente inferior a 100%, aunque en formas de realización preferidas, la cantidad de secuencias terminales diferentes de CTATCTAT en los lotes de adenovirus de acuerdo con la invención es inferior al límite de detección. Por consiguiente, de acuerdo con la invención, los genomas de esencialmente todos los adenovirus en las composiciones o los lotes de partículas de adenovirus recombinantes comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'. El término "esencialmente todos", tal como se emplea en la presente, hace referencia a una proporción de al menos 90%, preferiblemente de al menos 98%, más preferiblemente de al menos 99%, aún más preferiblemente de al menos 99.9%, e incluso de hasta 100% (de las partículas de adenovirus en la composición). A modo de ejemplo, esto puede determinarse con métodos como la PCR, con la cual puede detectarse fácilmente 1 partícula en 1000 y en las composiciones de partículas de adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención, no se detectaron adenovirus con las secuencias terminales originales.

El término "lote" de adenovirus, de acuerdo con la invención, hace referencia a una composición que ha sido producida en un procedimiento en un solo recipiente, o alternativamente puede hacer referencia a una pluralidad de partículas de adenovirus en una composición que está presente en un solo recipiente (por ejemplo, un biorreactor, una bolsa, un frasco, una botella, un vial para múltiples dosis, un vial para una sola dosis, una jeringa, etc.). Un lote de adenovirus de acuerdo con la invención o una composición que comprende adenovirus de acuerdo con la invención preferiblemente comprenden al menos 10^7 partículas de adenovirus recombinantes, y en determinadas formas de realización, comprenden al menos 10^8 , 10^9 , 10^{10} partículas de adenovirus. Además de los adenovirus recombinantes, un lote o una composición pueden comprender o no otros componentes relevantes.

El término "recombinantes", tal como se emplea en la presente con relación a los adenovirus, hace referencia al resultado de una modificación por parte del hombre, por ejemplo, a una alteración en los extremos basada en una clonación y/o a la introducción de un gen heterólogo, por lo que dichos adenovirus no son adenovirus salvajes.

En la presente, las secuencias se describen en el sentido 5' a 3', lo cual es habitual en la técnica.

El término "proteína de la cápside de un adenovirus" hace referencia a una proteína que se encuentra en la cápside de un adenovirus y que participa en la determinación del serotipo y/o el tropismo de un adenovirus particular. Las proteínas de la cápside de los adenovirus típicamente abarcan las proteínas que están relacionadas con las fibras, con las pentonas y/o con las hexonas. Un adenovirus de un serotipo determinado de acuerdo con la invención (o un adenovirus que "está basado" en dicho serotipo) típicamente comprende proteínas relacionadas con las fibras, las pentonas y/o las hexonas del serotipo en cuestión, y preferiblemente comprende proteínas relacionadas con las fibras, las pentonas y las hexonas de dicho serotipo. Estas proteínas típicamente están codificadas por el genoma de los adenovirus recombinantes. Los adenovirus recombinantes de un serotipo determinado opcionalmente pueden comprender y/o codificar otras proteínas de adenovirus de otros serotipos.

Según se utiliza en la presente, un adenovirus recombinante "está basado" en un adenovirus por derivación del tipo salvaje, al menos en la secuencia. Este resultado puede obtenerse sobre la base de una clonación molecular, mediante el uso del genoma salvaje o de partes de éste como material de partida. También es posible usar secuencias conocidas de genomas de adenovirus salvajes para generar nuevos genomas (o partes de estos) a través de un procedimiento de síntesis del ADN, que puede ser puesto en práctica de acuerdo con métodos de rutina, por compañías relacionadas con el área de la síntesis del DNA y/o con la clonación molecular (por ejemplo, GeneArt, GenScripts, Invitrogen o Eurofins). De esta manera, y a modo de ejemplo no limitativo, un adenovirus recombinante que no está basado en el adenovirus humano Ad4 es un adenovirus recombinante que no comprende pentonas, hexonas o fibras del adenovirus humano Ad4, mientras que se considera que un adenovirus recombinante que comprende hexonas, pentonas y fibras del adenovirus humano Ad35 es un adenovirus recombinante que está basado en Ad35, etc.

Merced a las investigaciones extensas que se han llevado a cabo sobre los serotipos de los adenovirus y sobre la organización de su genoma, aquellos versados en la técnica han de conocer los límites de las ITR en el genoma de los adenovirus. La secuencia CTATCTAT está localizada en las posiciones más cercanas a los extremos del genoma de los adenovirus recombinantes de acuerdo con la presente invención. A modo de ejemplo, la cadena

superior de la ITR izquierda de la variante salvaje del adenovirus Ad5 comienza con 5'-CATCATCA...-3' y en el contexto de la presente invención, esta secuencia se modifica para obtener la secuencia preferida 5'-CTATCTAT...-3'. Aquellos versados en la técnica han de saber que la ITR derecha, que se extiende en el sentido 5' a 3', está localizada en la cadena inferior.

La modificación de una secuencia original (progenitora) para obtener una secuencia alterada de la invención puede efectuarse con diversos métodos, que han de resultar conocidos y habituales para aquellos versados en la técnica. Los ejemplos incluyen la generación directa de las secuencias, sobre la base de una PCR, o la subclonación a partir de los genomas originales de aquellos adenovirus en cuyos extremos se ha determinado que se encuentra la secuencia deseada.

Cuando se modifica la secuencia de un extremo, por ejemplo, mediante el uso de procedimientos de biología molecular, que pueden ser procedimientos de recombinación basados en plásmidos/cósmidos homólogos (véase, por ejemplo, WO 99/55132), mientras que no se modifica el otro extremo, durante la producción y la replicación, se copiará la ITR izquierda o derecha del adenovirus resultante, con lo que se obtendrá una población mixta de adenovirus que solamente comprenderán extremos modificados y adenovirus que solamente comprenderán extremos no modificados (que, si el cultivo y la propagación se llevan a cabo in vitro, según se indica en la presente, evolucionará hasta generar una población que comprenderá cada vez más extremos alterados, que comprenderán la secuencia CTATCTAT, debido a la ventaja en el crecimiento que confiere dicha secuencia terminal). Resulta preferible que un adenovirus recombinante de acuerdo con la presente invención comprenda un genoma que presente la secuencia CTATCTAT tanto en el extremo izquierdo como en el extremo derecho.

En este contexto, los adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.

Los vectores de la presente invención son adenovirus recombinantes, también denominados vectores basados en adenovirus recombinantes. La preparación de los vectores basados en adenovirus recombinantes es bien conocida en la técnica.

En determinadas formas de realización, un vector basado en un adenovirus de acuerdo con la invención presenta una deficiencia en la función de al menos un gen esencial de la región E1 del genoma del adenovirus, por ejemplo, de la región E1a y/o de la región E1b, que es imprescindible para la replicación del virus. En determinados aspectos, un vector basado en un adenovirus presenta una deficiencia en al menos una parte de la región no esencial E3. En determinados aspectos, el vector presenta una deficiencia en la función de al menos un gen esencial de la región E1 y en al menos una parte de la región no esencial E3. El vector basado en un adenovirus puede presentar "deficiencias múltiples", es decir, puede presentar una deficiencia en la función de uno o más genes esenciales, que pueden estar presentes en dos o más regiones de su genoma. A modo de ejemplo, los vectores basados en adenovirus, mencionados anteriormente, que presentan deficiencias en la región E1 o en las regiones E1 y E3 también pueden presentar deficiencias en al menos un gen esencial de la región E4 y/o la región E2 (por ejemplo, la región E2A y/o la región E2B).

Los vectores basados en adenovirus, los métodos para construirlos y los métodos para propagarlos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EE. UU. Nº 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 y 6113913 y en Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenovirus", capítulos 67 y 68, respectivamente, de Virology, B. N. Fields et al., editores, 3.ª edición, Raven Press, Ltd., Nueva York (1996), así como en otras referencias que se citan en la presente. Típicamente, la construcción de los vectores basados en adenovirus está basada en el uso de protocolos convencionales de biología molecular, tales como los que se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2.ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); Watson et al., Recombinant DNA, 2.ª edición, Scientific American Books (1992); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), así como en otras referencias que se citan en la presente.

Un adenovirus de acuerdo con la invención puede pertenecer a la familia Adenoviridae, y preferiblemente pertenece al género *Mastadenovirus*. Puede tratarse de un adenovirus que ataca a los seres humanos, pero también puede ser un adenovirus capaz de infectar otras especies, lo que abarca, sin limitaciones, los adenovirus que atacan a los bovinos (por ejemplo, el adenovirus bovino 3, BAdV3), los adenovirus que atacan a los caninos (por ejemplo, CAdV2), los adenovirus que atacan a los porcinos (por ejemplo, PAdV3 o PAdV5) y los adenovirus que atacan a los primates simiiformes (lo que incluye los adenovirus que atacan a los monos o a los hominoideos, tales como el adenovirus del chimpancé). Preferiblemente, el adenovirus es un adenovirus humano (HAdV o AdHu; en la presente, los adenovirus humanos se representan con la sigla Ad, sin que se detalle la especie: por ejemplo, la abreviatura "Ad5" se emplea como sinónimo de HAdV5, que hace referencia a los adenovirus humanos del serotipo 5) o un adenovirus de simio, tal como el adenovirus del chimpancé (ChAd, AdCh o SAdV).

Preferiblemente, los adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención son adenovirus de los que se ha informado que en estado salvaje comprenden una secuencia diferente (de la secuencia CTATCTAT, que por ejemplo, puede ser la secuencia CATCATCA, que puede hallarse con una frecuencia elevada) en el extremo 5'. En

la tabla I se detallan los 8 nucleótidos en el extremo 5' que han sido informados o inferidos para adenovirus de diversos serotipos. En US 2009/227000 se describe un adenovirus Ad11p que comprende la secuencia CTATCTAT en su extremo 5'. Los estudios más avanzados se llevaron a cabo con adenovirus humanos, los cuales resultan preferibles con relación a determinados aspectos de la invención. En determinados aspectos, los adenovirus recombinantes están basados en adenovirus humanos, pero no están basados en adenovirus humanos de los serotipos 3, 4, 7, 8, 9, 11p, 15, 21, 29, 37 ó 53. Los adenovirus recombinantes pueden estar basados en adenovirus humanos de los serotipos 1, 2, 5, 6, 10, 11a, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 22, 26, 28, 31, 34, 35, 36, 40, 41, 46, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 56 ó 57. Más preferiblemente, los adenovirus recombinantes están basados en adenovirus humanos de los serotipos 5, 11a, 26, 34, 35, 48, 49 ó 50. De acuerdo con un ejemplo particularmente preferido, los adenovirus son adenovirus humanos de uno de los serotipos 26, 35, 48, 49 ó 50. Una ventaja de estos serotipos es que presentan una prevalencia baja en el suero y/o que para ellos hay una titulación preexistente de anticuerpos neutralizadores baja en las poblaciones humanas. Los serotipos más preferidos para los adenovirus recombinantes son el serotipo humano 35 y el serotipo humano 26, los cuales han sido evaluados en análisis clínicos. La preparación de los vectores rAd26 se describe, por ejemplo, en WO 2007/104792 y en Abbink et al., (2007) *Virology* 81(9): 4654-63. Pueden hallarse ejemplos de secuencias de los genomas de los vectores Ad26 en el acceso GenBank EF 153474 y en SEQ ID N° 1 de WO 2007/104792. La preparación de los vectores rAd35 se describe, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. N° 7270811, en WO 00/70071 y en Vogels et al., (2003) *J. Virol.*, 77(15): 8263-71. Pueden hallarse ejemplos de secuencias de los genomas de los vectores Ad35 en el acceso GenBank AC_000019 y en la figura 6 de WO 00/70071.

Los adenovirus de los simios generalmente también presentan una prevalencia baja en el suero, y/o para ellos también suele haber una titulación preexistente de anticuerpos neutralizadores baja en las poblaciones humanas. Se han realizado numerosos trabajos con vectores basados en adenovirus de chimpancé (por ejemplo, US6083716, WO 2005/071093, WO 2010/086189 y WO 2010085984; Farina et al., 2001, *J. Virol.*, 75: 11603-13; Cohen et al., 2002, *J. Gen. Virol.*, 83: 151-55; Kobinger et al., 2006, *Virology* 346: 394-401; y Tatsis et al., 2007, *Molecular Therapy*, 15: 608-17; también puede consultarse la revisión de Bangari y Mittal, 2006, *Vaccine*, 24: 849-62, y la revisión de Lasaro y Ertl, 2009, *Mol. Ther.*, 17: 1333-39). Por lo tanto, en otras formas de realización preferidas, los adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención están basados en adenovirus de simio, por ejemplo, en adenovirus de chimpancé. En determinadas formas de realización, los adenovirus recombinantes están basados en adenovirus de simio de los tipos 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 que se mencionaron con anterioridad son conocidas y para otros, pueden obtenerse sobre la base de procedimientos de rutina.

Los adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención pueden presentar deficiencias en la replicación o pueden ser capaces de replicarse normalmente.

En determinadas formas de realización, los adenovirus presentan deficiencias en la replicación, por ejemplo, debido a que contienen una supresión en la región E1 del genoma. Aquellos versados en la técnica han de saber que, en el caso de supresiones de las regiones esenciales del genoma de un adenovirus, las funciones codificadas por las regiones en cuestión, deben proporcionarse in trans, preferiblemente en la célula que se emplea para la producción, es decir, cuando se elimina una parte o la totalidad de las regiones E1, E2 y/o E4 de los adenovirus, éstas han de estar presentes en la célula que se emplee para la producción, por ejemplo, que estén integradas en su genoma o que tomen la forma de adenovirus asistentes o plásmidos asistentes. Los adenovirus también pueden presentar una supresión en la región E3, que es prescindible para la replicación, por lo que no es necesario complementar una supresión de este tipo.

En la presente, para la producción podrá usarse cualquier célula (a la cual se le denomina en la presente y en la técnica en ocasiones "célula de envasado", "célula huésped" o "célula complementaria") en la que pueda propagarse el adenovirus deseado. Por ejemplo, los vectores basados en adenovirus recombinantes podrán propagarse en células que se empleen en la producción y sean apropiadas para complementar las deficiencias que puedan presentar los adenovirus. En el genoma de las células que se empleen para la producción, preferiblemente habrá al menos una secuencia propia de los adenovirus E1, con lo que se posibilitará la complementación de aquellos adenovirus recombinantes que presenten una supresión en la región E1. Podrá usarse cualquier célula que sea apropiada para complementar una supresión en la región E1, por ejemplo, una célula de retina humana inmortalizada que comprenda la región E1, como es el caso de las células 911 o PER.C6 (véase la Patente de los EE. UU. N° 5994128), un aminocito que haya sido transformado con la región E1 (véase la Patente EP 1230354), una célula A549 que haya sido transformada con la región E1 (véanse, por ejemplo, WO 98/39411 y la Patente de los EE. UU. N° 5891690), una célula GH329:HeLa (Gao et al., 2000, *Human Gene Therapy*, 11: 213-219), 293 o una célula semejante. En determinados aspectos, las células que se emplean para la producción pueden ser, por ejemplo, células HEK293, células PER.C6, células 911, células IT293SF o células semejantes.

En el caso de los adenovirus que presentan deficiencias en la región E1 y que no derivan de los adenovirus de los subgrupos C o E, resulta preferible que se cambie la secuencia que codifica el ORF 6 de la región E4 que no sea propia de los adenovirus de los subgrupos C o E por una secuencia que codifique el ORF 6 de la región E4 que

provenza de los adenovirus del subgrupo C, como es el caso de los adenovirus Ad5. De esta manera, los adenovirus podrán propagarse en líneas de células complementarias conocidas donde se expresen genes que codifiquen la región E1 de los adenovirus Ad5, como es el caso de las células 293 o las células PER.C6 (véanse, por ejemplo, Havenga et al., 2006, *J. Gen. Virol.*, 87: 2135-2143, y WO 03/104467.

En ejemplos alternativos, no será necesario introducir una región heteróloga que codifique el ORF 6 de la región E4 (que por ejemplo, provenga de un adenovirus Ad5) en el vector basado en un adenovirus. En lugar de esto, el vector que presente una deficiencia en la región E1 y que no esté relacionado con los subgrupos C o E podrá propagarse en una línea de células en las que se exprese tanto la región E1 como un ORF 6 de la región E4 que sea compatible, por ejemplo, en la línea de células 293-ORF6, en las que se expresa la región E1 y el ORF 6 de la región E4 de los adenovirus Ad5 (véanse, por ejemplo, Brough et al., 1996, *J. Virol.*, 70: 6497-501, donde se describe la generación de las células 293-ORF6; Abrahamsen et al., 1997, *J. Virol.*, 71: 8946-51; y Nan et al., 2003, *Gene Therapy* 10: 326-36, donde se describe la generación de vectores basados en adenovirus que no pertenecen al subgrupo C de los que se ha eliminado la región E1 a partir de la línea de células que se ha mencionado).

Como alternativa, podrá usarse una línea de células complementarias en las que se exprese una región E1 que sea propia del serotipo que se desee propagar (véanse, por ejemplo, WO 00/70071 y WO 02/40665).

En el caso de los adenovirus del subgrupo B, como es el caso de Ad35, que comprenden una supresión en la región E1, resulta preferible que se retenga el extremo 3' del marco abierto de lectura de E1B 55K en el adenovirus, por ejemplo, los 166 pares de bases que se encuentran directamente hacia el extremo 5' del marco abierto de lectura de pIX, o bien que se retenga un fragmento que los comprenda, que podrá ser un fragmento de 243 pares de bases que se encuentre directamente hacia el extremo 5' del codón de inicio de pIX (que comprende un sitio de restricción para Bsu36I en el extremo 5' del genoma de Ad35), con el propósito de que se incremente su estabilidad, ya que el promotor del gen pIX reside en parte en el área que se ha mencionado (véanse, por ejemplo, Havenga et al., 2006, *J. Gen. Virol.*, 87: 2135-2143, y WO 2004/001032).

El término "ácido nucleico heterólogo" (también denominado en la presente "transgén"), aplicado a un adenovirus de acuerdo con la invención, hace referencia a un ácido nucleico que no está presente de manera natural en el adenovirus. Se lo introduce en el adenovirus, por ejemplo, sobre la base de procedimientos convencionales de biología molecular. Puede codificar una proteína de interés o una parte de ésta. A modo de ejemplo, es posible clonarlo en la localización en la que se ha eliminado la región E1 o E3 de un vector basado en un adenovirus. Un transgén generalmente está unido operativamente a secuencias que son apropiadas para controlar la expresión, lo que, por ejemplo, puede ser el resultado de la colocación de un ácido nucleico que codifica uno o más transgenes bajo el control de un promotor. Es posible agregar más secuencias reguladoras. Para expresar los transgenes, pueden usarse numerosos promotores conocidos por aquellos versados en la técnica. Un ejemplo no limitativo de un promotor apropiado para llevar a cabo la expresión en las células eucariotas es el promotor del CMV (US 5385839), que por ejemplo, puede ser el promotor inmediato temprano del CMV, que puede comprender los nucleótidos -735 a +95 del potenciador/promotor inmediato temprano del gen correspondiente del CMV. Detrás de los transgenes, puede haber presente una señal de poliadenilación, por ejemplo, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (US 5122458).

En determinados aspectos, puede resultar deseable expresar más de una proteína a partir de un único adenovirus, y en estos casos, pueden unirse numerosas secuencias codificantes, de manera tal de formar un único transcrito en un único casete de expresión o pueden estar presentes en dos casetes de expresión separados, que pueden clonarse en partes diferentes del genoma del adenovirus.

La identidad del transgén no es fundamental en el contexto de la presente invención, que podrá ponerse en práctica con cualquier adenovirus que comprenda cualquier transgén. Los transgenes apropiados han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica, y por ejemplo, pueden incluir transgenes que abarcan marcos abiertos de lectura, que pueden ser marcos abiertos de lectura que codifican polipéptidos que presentan efectos terapéuticos y que pueden ser útiles en una terapia génica, o que también pueden ser polipéptidos que pueden desencadenar una respuesta inmune deseada cuando se emplea el vector rAd en el contexto de una vacunación. Los ácidos nucleicos heterólogos particularmente preferidos son los genes que codifican los determinantes antigénicos de interés, contra los cuales se desea desencadenar una respuesta inmune. Típicamente, los determinantes antigénicos de este tipo también se conocen como antígenos. Un vector basado en un adenovirus podrá codificar cualquier antígeno deseado. En ejemplos típicos, los antígenos pueden ser péptidos, polipéptidos o proteínas provenientes de organismos que pueden provocar enfermedades o trastornos. Por lo tanto, en otro aspecto preferido, los ácidos nucleicos heterólogos de interés codifican determinantes inmunogénicos. Más preferiblemente, los determinantes inmunogénicos son antígenos provenientes de bacterias, de virus, de levaduras o de parásitos. Las enfermedades que pueden ser provocadas por estos organismos generalmente se conocen como "enfermedades infecciosas" (aunque no se limitan a los organismos que pueden "infectar", sino que también abarcan aquellos que pueden ingresar en un huésped y provocar una enfermedad). Los antígenos que se conocen como "autoantígenos", que por ejemplo, pueden ser antígenos tumorales, también son conocidos en la técnica y pueden estar codificados por los ácidos nucleicos heterólogos que se hallan en los adenovirus recombinantes de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos no limitativos de determinantes antigénicos (o antígenos) incluyen los que provienen de los organismos

que pueden provocar la malaria, como es el caso de *Plasmodium falciparum*, de los organismos que pueden provocar la tuberculosis, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, de levaduras o de virus. En otras formas de realización preferidas, en las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden usarse antígenos de diversos virus, como es el caso de los flavivirus (por ejemplo, el virus del Nilo occidental, el virus de la hepatitis C, el virus de la encefalitis japonesa o el virus del dengue), el virus del ébola, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de Marburg. En un ejemplo, dicho antígeno es la proteína CS o una parte inmunogénica de ésta, que proviene de *P. falciparum* (pueden hallarse ejemplos de vectores basados en adenovirus que codifican la proteína CS en Havenga et al., 2006, J. Gen. Virol., 87: 2135-2143, Ophorst et al., 2007, Vaccine, 25:1426-36, y WO 2004/055187). En otro aspecto, el determinante antigénico es una proteína de un antígeno o una proteína de fusión de varios antígenos de *M. tuberculosis*, como es el caso de las proteínas Ag85A, Ag85B y/o TB10.4, o una o más partes inmunogénicas de éstas (la construcción y la producción de las vacunas para la TB que están basadas en virus se describen, por ejemplo, en WO 2006/053871). En aún otro aspecto, el determinante antigénico es una glucoproteína viral o una parte inmunogénica de ésta, que puede ser, por ejemplo, una GP de un filovirus, tal como el virus del ébola o el virus de Marburg (véanse, por ejemplo, Sullivan et al., (2003) Nature, 424(6949): 681-684; Sullivan, et al., (2006) PLoS Med., 3(6): e177; y Geisbert et al., (2011) J. Virol., 85: 4222-4233). En aún otros aspectos, el determinante inmunogénico proviene de una proteína del VIH, tal como gag, pol, env, nef o una variante de cualquiera de ellas (pueden hallarse ejemplos de vacunas para el VIH basadas en adenovirus en WO 2009/026183, WO 2010/096561, WO 2006/120034, WO 02/22080 o WO 01/02607). En otros ejemplos, el determinante antigénico es una proteína HA, NA, M o NP o una parte inmunogénica de cualquiera de ellas, que por ejemplo, puede provenir de un virus de la influenza (véanse, por ejemplo, Zhou et al., 2010, Mol. Ther., 18:2182-9; Hu et al., 2011, Virus Res., 155: 156-62; y la revisión de Vemula y Mittal, 2010, Expert Opin. Biol. Ther., 10: 1469-87). En otras formas de realización, el determinante antigénico es una proteína HA o una parte inmunogénica de ésta, que puede provenir de un virus del sarampión (véase, por ejemplo, WO 2004/037294). En otros aspectos, el determinante antigénico es una glucoproteína del virus de la rabia (véase, por ejemplo, Zhou et al., 2006, Mol. Ther., 14: 662-672).

En la invención también se provee un método con el que puede prepararse un lote de partículas de adenovirus recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos esencialmente idénticas en el extremo 5' de sus genomas, donde el método comprende a) poner en práctica un paso de clonación molecular para cambiar los extremos 5' de origen natural de los genomas de los adenovirus por extremos 5' alterados, que como nucleótidos terminales comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT; b) propagar los adenovirus recombinantes que comprenden los extremos 5' alterados en células huésped; y c) cosechar los adenovirus recombinantes para obtener un lote de partículas de adenovirus recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'. En un aspecto preferido, los extremos 5' de los genomas se modifican de manera activa sobre la base de procedimientos de clonación molecular, los cuales son de uso habitual y han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica de la biología molecular. En el contexto de la invención, la identificación de estas secuencias terminales ventajosas CTATCTAT posibilita la puesta en práctica de este paso activo. Este paso puede resultar particularmente ventajoso cuando se emplean adenovirus que comprenden secuencias diferentes en su extremo 5' (es decir, diferentes de CTATCTAT) como material de partida o base para la generación de un (lote o una composición de) adenovirus recombinante(s) de acuerdo con la invención, los cuales por ejemplo, pueden pertenecer a cualquiera de los serotipos preferidos de la invención que se describen en la presente. Una ventaja está relacionada con el control y la certeza de que la secuencia deseada CTATCTAT estará presente desde el comienzo en la totalidad de los genomas de los adenovirus que se empleen como material de partida en el paso b), y debido a que esta secuencia resulta particularmente estable, según se describe en la presente, los lotes de adenovirus que se obtengan en el paso c) comprenderán partículas de adenovirus las cuales tienen todas esencialmente la misma secuencia deseada en sus extremos 5'.

Por otro lado, como una alternativa a la clonación molecular, será posible aprovechar las variaciones de origen natural y seleccionar aquellos adenovirus que presenten secuencias alteradas CTATCTAT en sus extremos, de manera tal de obtener un material de partida con extremos 5' estables que sea apropiado para propagarlo y obtener lotes de adenovirus en cualquier escala. Por ende, como alternativa, se provee un método con el que puede prepararse un lote de partículas de adenovirus recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos esencialmente idénticas en el extremo 5' de sus genomas, donde el método comprende: a) poner en práctica un procedimiento para purificar adenovirus en placas, donde dichos adenovirus no son adenovirus humanos de los serotipos 3, 4, 7, 8, 9, 11p, 15, 21, 29, 37 ó 53 o formas recombinantes de éstos, de manera tal de aislar los adenovirus o adenovirus recombinantes, a partir de una única placa, donde dichos adenovirus o dichos adenovirus recombinantes comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5' de sus genomas; b) propagar los adenovirus recombinantes que se obtuvieron a partir de una única placa en el paso a) en células huésped; y c) cosechar los adenovirus recombinantes para obtener un lote de partículas de adenovirus recombinantes, donde los genomas de esencialmente todas las partículas comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'. En este caso, el paso activo abarca la preparación de una única placa de adenovirus (recombinantes) y la determinación o la confirmación de que su genoma comprende la secuencia deseada CTATCTAT en el extremo 5'. Aquellos versados en la técnica han de apreciar que el paso a) de este ejemplo podrá ponerse en práctica con adenovirus que ya sean adenovirus recombinantes o con un aislado de adenovirus que todavía sean salvajes, en donde en este último caso, los adenovirus recombinantes se elaborarán

antes del paso b) (por ejemplo, sobre la base de una clonación, mediante la cual podrán introducirse los transgenes en el genoma). Aquellos versados en la técnica de la manipulación de adenovirus han de conocer los procedimientos de purificación basados en placas, con los cuales puede asegurarse que el material de partida para su elaboración posterior es homogéneo y que proviene de un único aislado. La selección activa de un adenovirus (recombinante) que comprendiera la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5' de su genoma no había sido descrita con anterioridad, y antes de la presentación de la presente invención, tampoco habría tenido sentido alguno. Por el contrario, la identificación de una secuencia de este tipo, se la habría considerado una anomalía y las placas se habrían descartado por contener una alteración genética antes de la presente invención. Se considera un logro de la presente invención, la selección de estos adenovirus (recombinantes) como material de partida para asegurar la estabilidad genética y dar como resultado lotes de adenovirus recombinantes tales que los genomas de esencialmente todos los adenovirus comprendan los nucleótidos idénticos deseados en su extremo 5'. Los adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención podrían presentar características de replicación superiores.

Una célula huésped que puede obtenerse de acuerdo con los métodos de acuerdo con la invención puede ser una célula de envasado, que puede ser útil para complementar las deficiencias en los genomas de los adenovirus recombinantes, las cuales, por ejemplo, pueden ser deficiencias en la región E1. Los pasos b) y c) de los métodos para elaborar lotes de adenovirus recombinantes de acuerdo con la invención son de uso habitual y han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica.

En determinados aspectos, el paso b) de estos métodos se lleva a cabo en un biorreactor, que puede tener un volumen de entre aproximadamente 1 litro y aproximadamente 20000 litros. De este modo, podrá obtenerse una cantidad de las composiciones de adenovirus deseadas que sea suficiente para una aplicación a escala industrial. El término "aproximadamente", aplicado a los valores numéricos que se proveen en la presente, hace referencia a un rango de $\pm 10\%$. En determinados ejemplos, el volumen de trabajo es de entre 10 l y 10000 l, por ejemplo, de entre 20 l y 2000 l. El volumen de trabajo es el volumen efectivo del cultivo en el biorreactor. El volumen del biorreactor podrá ser seleccionado por aquellos versados en la técnica sobre la base de la demanda real. A través de la presente invención, puede asegurarse que esencialmente todas las partículas de los adenovirus en los lotes finales que se produzcan comprendan extremos idénticos, es decir, que sean homogéneas desde el punto de vista genético, lo cual resultará deseable en un producto farmacéutico.

La mayoría de los cultivos en suspensión a gran escala se operan como procesos en lotes individuales o consecutivos, que son los más sencillos y adaptables a cualquier escala. En la actualidad, se están tornando más comunes los procesos continuos que están basados en el principio de la perfusión, y también pueden resultar apropiados (véanse, por ejemplo, WO 2010/060719 y WO 2011/098592, donde se describen métodos apropiados para obtener y purificar grandes cantidades de adenovirus recombinantes).

Las células que se emplean para la producción se cultivan para incrementar su cantidad y la cantidad y/o la titulación de los virus. Las células se cultivan para posibilitar el metabolismo, el crecimiento, la división y/o la generación de los virus de interés de acuerdo con la invención. Esto puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica, e incluye sin carácter limitante el suministro de nutrientes para las células, por ejemplo, a través de un medio de cultivo apropiado. Los medios de cultivo apropiados han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica, y generalmente pueden obtenerse en grandes cantidades a partir de proveedores comerciales o pueden elaborarse a medida, de acuerdo con protocolos convencionales. El cultivo puede llevarse a cabo, por ejemplo, en placas, en botellas agitadas o en biorreactores, mediante el uso de sistemas en lotes individuales o consecutivos, sistemas continuos o sistemas semejantes. Las condiciones apropiadas para cultivar las células han de resultar conocidas (véanse, por ejemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Paterson, editores (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)).

Típicamente, los adenovirus serán expuestos a las células que sean apropiadas para llevar a cabo la producción, que se encontrarán en un cultivo, de manera tal que éstas puedan captarlo. Usualmente, la agitación óptima es de aproximadamente entre 50 y 300 rpm, típicamente es de aproximadamente 100-200 rpm, y por ejemplo, puede ser de aproximadamente 150 rpm. La DO típica es de 20-60%, por ejemplo, puede ser de 40%. El pH óptimo es de entre 6,7 y 7,7. La temperatura óptima es de entre 30°C y 39°C, por ejemplo, puede ser de 34-37°C. La MOI óptima es de entre 5 y 1000, por ejemplo, puede ser de aproximadamente 50-300. Típicamente, los adenovirus infectan las células que se emplean para la producción de manera espontánea, y usualmente el contacto entre dichas células y las partículas de los rAd es suficiente para que tenga lugar la infección. En general, se le agrega una solución madre que comprende los adenovirus al cultivo para iniciar la infección, y posteriormente, los adenovirus se propagan en las células que se emplean para la producción. Todos estos procedimientos son de uso habitual y han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. Las soluciones madre que comprenden los adenovirus de acuerdo con la invención pueden comprender partículas de adenovirus recombinantes, y los genomas de esencialmente todas las partículas de los adenovirus en las soluciones madre pueden comprender la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.

Una vez que tiene lugar la infección con los adenovirus, los virus pueden replicarse en las células, con lo cual puede incrementarse su cantidad. Este proceso se conoce en la presente como la propagación de los adenovirus. Eventualmente, la infección de las células con los adenovirus da como resultado su lisis. Sobre la base de las características líficas de los adenovirus, pueden ponerse en práctica dos modalidades de elaboración diferentes. La primera modalidad está basada en la cosecha de los virus antes de la lisis de las células, y comprende el uso de factores externos para efectuar dicha lisis. La segunda modalidad está basada en la cosecha del sobrenadante que comprende los virus después de la lisis (prácticamente) completa de las células por parte del virus producido (véase, por ejemplo, la Patente de los EE. UU. 6485958, donde se describe la cosecha de adenovirus sin la lisis de las células huésped mediante el uso de un factor externo). Resulta preferible emplear factores externos para lisar de manera activa las células y cosechar los adenovirus.

Aquellos versados en la técnica han de conocer diversos métodos para lisar las células de manera activa. Se los describe, por ejemplo, en WO 98/22588, p. 28-35. Los métodos útiles en este contexto incluyen, por ejemplo, los ciclos de congelación-descongelación, la agitación en una fase sólida, la lisis hipertónica y/o hipotónica, la agitación en una fase líquida, la sonicación, la extrusión a presión elevada, la lisis con detergentes, las combinaciones de estos métodos y los métodos semejantes. En un ejemplo, las células se lisan usando al menos un detergente. El uso de un detergente para la lisis resulta ventajoso, ya que se trata de un método sencillo, cuya escala puede modificarse con facilidad.

Los detergentes que pueden emplearse y la modalidad de su uso han de resultar conocidos en general para aquellos versados en la técnica. A modo de ejemplo, puede consultarse WO 98/22588, p. 29-33. Los detergentes pueden ser aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos. La concentración de los detergentes puede variar, y por ejemplo, puede hallarse en el rango aproximado de 0,1%-5% (p/p). En un aspecto, el detergente que se emplea es Triton X-100.

Pueden emplearse nucleasas para remover los contaminantes, lo cual, en el contexto de las células que se emplean para la producción, abarca principalmente los ácidos nucleicos. Los ejemplos de nucleasas que son apropiadas para usar en la presente invención incluyen Benzonase®, Pulmozyme® y cualquier otra ADNasa o ARNasa de uso habitual en la técnica. En ejemplos preferidos, la nucleasa es Benzonase®, que puede hidrolizar rápidamente los ácidos nucleicos al hidrolizar los enlaces de fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos, con lo que puede reducirse la viscosidad del lisado celular. Benzonase® puede obtenerse en el proveedor comercial Merck KGaA (código W214950). La concentración en la cual puede emplearse la nucleasa preferiblemente se encuentra en el rango de 1-100 unidades/ml. Como alternativa a un tratamiento con una nucleasa, o adicionalmente, es posible separar el ADN de las células huésped de los preparados de adenovirus durante la purificación de éstos, sobre la base de una precipitación selectiva, para lo cual pueden emplearse agentes de precipitación selectivos como el bromuro de domifeno (véanse, por ejemplo, US 7326555, Goerke et al., 2005, Biotechnology and bioengineering, Vol. 91: 12-21, WO 2011/045378 y WO 2011/045381).

Los métodos para cosechar los adenovirus a partir de los cultivos que comprenden las células que se emplean para la producción se describen en detalle en WO 2005/080556.

En determinadas formas de realización, los adenovirus cosechados también se someten a una purificación adicional. La purificación de los adenovirus puede llevarse a cabo en varios pasos, que pueden abarcar una depuración, una ultrafiltración, una diafiltración o una separación sobre la base de una cromatografía, tal como se describe, por ejemplo, en WO 05/080556. La depuración puede basarse en un paso de filtración, en el que pueden eliminarse los residuos celulares y otras impurezas del lisado celular. La ultrafiltración se emplea para concentrar la solución que comprende el virus. La diafiltración, o intercambio de amortiguadores, que puede llevarse a cabo en un dispositivo de ultrafiltración, es un método apropiado para remover y cambiar las sales, los azúcares y otros elementos semejantes. Aquellos versados en la técnica han de saber cómo determinar las condiciones óptimas para cada paso de purificación. En WO 98/22588 también se describen métodos para producir y purificar vectores basados en adenovirus. Estos métodos comprenden cultivar las células huésped, infectarlas con adenovirus, cosecharlas y lisarlas, concentrar el lisado en bruto, cambiar el amortiguador en dicho lisado, tratarlo con una nucleasa y someter el virus a una purificación adicional a través de una cromatografía.

Preferiblemente, en la purificación se emplea al menos un paso de cromatografía, tal como se describe, por ejemplo, en WO 98/22588, p. 61-70. Se han descrito numerosos procesos para llevar a cabo el paso de purificación adicional de los adenovirus, que suelen comprender procedimientos de cromatografía. Aquellos versados en la técnica han de conocer estos procesos y han de poder realizar modificaciones exactas en los procedimientos de cromatografía para optimizarlos. A modo de ejemplo, es posible purificar los adenovirus a través de diversos pasos basados en procedimientos de cromatografía de intercambio aniónico, según se describe, por ejemplo, en WO 2005/080556. Se han descrito una cantidad significativa de métodos diferentes para purificar los adenovirus, que han de resultar conocidos para aquellos versados en la técnica. Se describen otros métodos para producir y purificar los adenovirus, por ejemplo, en WO 00/32754, WO 04/020971, US 5837520, US 6261823 y WO 2006/108707.

En el contexto de la administración en los seres humanos, en la presente invención pueden emplearse composiciones farmacéuticas que comprenden un rAd y un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

De esta manera, el término “farmacéuticamente aceptable” denota que el vehículo o el excipiente, en las dosis y las concentraciones que se emplean, no dan como resultado efectos indeseables o dañinos en los sujetos a los que se los administra. Los vehículos y los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica (véanse Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, A. R. Gennaro, editor, Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer y L. Hovgaard, editores, Taylor y Francis (2000); y Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3.^a edición, A. Kibbe, editor, Pharmaceutical Press (2000)). El rAd purificado preferiblemente se formula y se administra en forma de una solución estéril, aunque también es posible emplear preparaciones liofilizadas. Las soluciones estériles se elaboran sobre la base de una filtración bajo condiciones estériles o con métodos conocidos en la técnica. Posteriormente, las soluciones se liofilizan o se colocan en recipientes apropiados para envasar dosis farmacéuticas. El pH de estas soluciones generalmente se halla en el rango de entre 3,0 y 9,5, por ejemplo, entre 5,0 y 7,5. El rAd típicamente se encuentra en una solución que comprende un amortiguador apropiado, y que también puede contener una sal. Opcionalmente, puede haber presente un agente estabilizador, tal como la albúmina. En determinados aspectos, se agrega un detergente. En determinados ejemplos, el rAd puede formularse en una preparación inyectable. Las formulaciones de este tipo pueden comprender cantidades eficaces del rAd, típicamente son soluciones líquidas, suspensiones líquidas o versiones liofilizadas estériles, y opcionalmente pueden contener estabilizadores o excipientes. Una vacuna basada en adenovirus también puede administrarse por vía intranasal, en forma de aerosol (véase, por ejemplo, WO 2009/117134).

A modo de ejemplo, los adenovirus pueden almacenarse en el mismo amortiguador que se emplea también para almacenar las referencias mundiales de adenovirus (Hoganson et al., Development of a stable adenoviral vector formulation, Bioprocessing, Marzo de 2002, p. 43-48), que comprende Tris 20 mM, pH 8, NaCl 25 mM y 2,5% de glicerol. La formulación de otro amortiguador que es útil para administrárselo a los seres humanos comprende Tris 20 mM, 2 MgCl₂ mM, NaCl 25 mM, 10% p/v de sacarosa y 0,02% p/v de polisorbato-80. Evidentemente, ha de ser posible emplear otros amortiguadores, y pueden hallarse diversos ejemplos de formulaciones apropiadas para almacenar preparaciones de (adeno)virus purificados y para llevar a cabo su administración farmacéutica en la Patente Europea N° 0853660, en la Patente de los EE. UU. 6225289 y en las solicitudes de patentes internacionales WO 99/41416, WO 99/12568, WO 00/29024, WO 01/66137, WO 03/049763, WO 03/078592 y WO 03/061708.

En determinados ejemplos, una composición que comprende adenovirus también comprende uno o más coadyuvantes. Se sabe que los coadyuvantes son útiles para incrementar aún más la respuesta inmune contra el determinante antigénico que se administra. A modo de ejemplo, en WO 2007/110409, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden adenovirus y coadyuvantes apropiados. Los términos “coadyuvante” y “estimulante inmune” se usan indistintamente en la presente, y abarcan aquellas sustancias que son útiles para estimular el sistema inmune. En este contexto, se emplea un coadyuvante para incrementar la respuesta inmune que se genera con los vectores basados en adenovirus de acuerdo con la invención. Los ejemplos de coadyuvantes apropiados incluyen las sales de aluminio, tales como el hidróxido de aluminio y/o el fosfato de aluminio, las emulsiones oleosas (las emulsiones de aceite en agua), que pueden ser emulsiones de escualeno y agua, tales como MF59 (véase, por ejemplo, WO 90/14837), las formulaciones a base de saponina, tales como QS21, los complejos inmunoestimulantes (ISCOMS; véanse, por ejemplo, US 5057540, WO 90/03184, WO 96/11711, WO 2004/004762 y WO 2005/002620), los derivados de bacterias o de microbios, tales como el monofosforil lípido A (MPL), el MPL 3-O-desacilado (3dMPL), los oligonucleótidos que contienen motivos CpG, las toxinas bacterianas que pueden ribosilar el ADP o las mutantes de éstas, como es el caso de la enterotoxina LT de *E. coli* lábil ante el calor o la toxina CT del cólera, y semejantes. También es posible usar coadyuvantes codificados por vectores, por ejemplo, mediante el uso de un ácido nucleico heterólogo que codifica una fusión entre el dominio de oligomerización de la proteína que puede unirse a C4 (C4bp) y el antígeno de interés (véase, por ejemplo, Solabomi et al., 2008, Infect. Immun., 76: 3817-23). En determinados aspectos, las composiciones comprenden aluminio como coadyuvante, por ejemplo, en forma de hidróxido de aluminio, de fosfato de aluminio, de fosfato de aluminio y potasio o de una combinación de éstos, en una concentración de aluminio de entre 0,05 y 5 mg por dosis, por ejemplo, de entre 0,075 y 1,0 mg por dosis.

En otros aspectos, las composiciones no comprenden coadyuvantes.

Las composiciones de adenovirus pueden administrárselos a sujetos que pueden ser sujetos humanos. La dosis total de los adenovirus que se le administra a los sujetos en cada administración puede variar, lo cual ha de resultar evidente para aquellos versados en la técnica. En general, la dosis es de entre 1×10^7 partículas virales (vp) y 1×10^{12} vp, preferiblemente es de entre 1×10^8 vp y 1×10^{11} vp, y por ejemplo, puede ser de entre 3×10^8 y 5×10^{10} vp, tal como entre 10^9 y 3×10^{10} vp.

La administración de las composiciones de adenovirus puede llevarse a cabo a través de rutas convencionales de administración. Los aspectos no limitativos abarcan la administración parenteral tal como, por medio de una inyección, por ejemplo por vía intradérmica o intramuscular, etc., o una administración subcutánea o transcutánea o a través de una mucosa, por ejemplo las rutas intranasal u oral, y similares. En un ejemplo, una composición se administra por medio de una inyección intramuscular, por ejemplo, en el músculo deltoide del brazo o en el músculo vastus lateralis del muslo. Aquellos versados en la técnica han de conocer las diversas modalidades posibles para administrar una composición, por ejemplo, una vacuna, con el propósito de inducir una respuesta inmune contra los uno o más antígenos que comprende.

El término “sujeto”, tal como se lo emplea en la presente, preferiblemente hace referencia a un mamífero, que puede ser, por ejemplo, un roedor, tal como un ratón, un primate no humano o un ser humano. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano.

5 También es posible realizar una o más administraciones de refuerzo con una o más vacunas basadas en adenovirus. Si se recurre a una vacunación de refuerzo, típicamente se la administra al mismo sujeto entre una semana y un año después de la primera administración de la composición (que en estos casos se conoce como la “vacunación inicial”), preferiblemente entre dos semanas y cuatro meses después de la primera administración. En regímenes de refuerzo alternativos, a los sujetos también pueden administrárseles diversos vectores, por ejemplo, 10 uno o más adenovirus de serotipos diferentes, o bien vectores de tipos diferentes, que pueden comprender MVA, ADN o proteínas, como vacunaciones iniciales o de refuerzo.

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos, que se proveen para facilitar su comprensión.

15 EJEMPLOS

Métodos

Plásmidos:

20 La secuencia de la ITR alternativa para el adenovirus Ad35 se introdujo en la ITR izquierda por medio de una clonación en pAdapt, mientras que la secuencia de la ITR alternativa para el adenovirus Ad5 se introdujo en la ITR derecha por medio de una clonación en plásmidos pBr (véanse, por ejemplo, Havenga, M., et al., 2006, J. Gen. Virol., 87: 2135-2143; Havenga, M., et al., 2001, J. Virol., 75: 3335-3342). Para introducir la secuencia de la ITR 25 alternativa en la ITR izquierda, se puso en práctica una fusión basada en una PCR con un cebador directo que comprendió un sitio para Scal (GTGACTGGTGAGTACTC, SEQ ID N° 1), un cebador inverso que comprendió un sitio para AvrII (GACCACCTAGGCTGAC, SEQ ID N° 2) y un par de cebadores directo e inverso para la fusión que comprendieron la secuencia de la ITR alternativa (el cebador directo con la ITR alternativa 1 fue TTAATTAATCGATCTATCTATATAATATACCTTATAG, SEQ ID N° 3, el cebador directo con la ITR alternativa 2 fue 30 GATCTATCTATATAATATACCTTATAGATGGAATGG, SEQ ID N° 4, y el cebador inverso con la ITR alternativa fue ATTATATAGATAGATCGATTAATTAATTCGAACCC, SEQ ID N° 5). En la PCR, se usaron dos cebadores directos que estuvieron parcialmente superpuestos con la ITR, de manera tal de amplificar uno de los fragmentos de la fusión e incrementar la eficiencia del procedimiento en conexión con una región extremadamente rica en AT en el molde. El producto de la fusión que se obtuvo por medio de la PCR primero se subclonó en el vector pTopo, con el fin de 35 facilitar su subclonación ulterior, y luego se insertó en el plásmido pAdapt35, más particularmente en los sitios para AvrII y para Scal en los transgenes correspondientes.

Para introducir la secuencia de la ITR alternativa en la ITR derecha, se puso en práctica una fusión basada en una PCR con un cebador directo que comprendió un sitio para NdeI, un cebador inverso que comprendió un sitio para 40 NruI y un par de cebadores directo e inverso para la fusión que comprendieron la secuencia de la ITR alternativa, sobre la base de una estrategia de fusión basada en una PCR que fue idéntica a la que se describió para la introducción de la ITR izquierda. El producto de la fusión que se obtuvo por medio de la PCR primero se subclonó en el vector pTopo y luego se insertó en el plásmido pBR.Ad35.PR.dE3 orf6/7, más particularmente en los sitios para 45 NdeI y para NruI.

Para generar los vectores basados en el adenovirus Ad5 con ITR alternativas, se empleó una estrategia como la que se describió con anterioridad.

Cultivo de las células:

50 Las células PER.C6 (Fallaux et al., 1998) se mantuvieron en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que comprendió 10% de suero fetal bovino (FBS) y estaba suplementado con $MgCl_2$ 10 mM. Las células A549, HEK293, Hep2, HeLa y MRC5 se obtuvieron en la ATCC y se mantuvieron en un DMEM con 10% de FBS.

Generación de los adenovirus, infecciones y pasajes:

55 De no indicarse lo contrario, todos los virus se generaron en células PER.C6, sobre la base de una recombinación homóloga simple o doble, y se los produjo como se describió con anterioridad (Havenga et al., 2006). En resumen, los plásmidos se introdujeron en las células PER.C6 por medio de una transfección, mediante el uso de lipofectamina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Life Technologies). Las células se cosecharon un día 60 después de observar un CPE completo, se las sometió a un ciclo de congelación y descongelación, se las centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos y se las almacenó a $-20^{\circ}C$. Se usaron entre 3 y 5 ml del lisado en bruto para inocular cuatro frascos T175 que comprendieron tres capas con células PER.C6 confluentes al 70%. Los virus se purificaron sobre la base de un método con dos pasos en el que se empleó CsCl. Finalmente, los virus se almacenaron en alícuotas a $-85^{\circ}C$.

65

Para investigar el cambio de la secuencia de la ITR original por la secuencia de la ITR alternativa, los diversos virus fueron sometidos a varias series de pasajes, para lo cual se empleó el material que comprendió el virus en bruto, que se obtuvo después de la purificación en placas, o bien se usaron lotes de virus que se purificaron como se describió con anterioridad. Con este propósito, las células se infectaron con el vector viral correspondiente. Un día después de observar un CPE completo, las células y los sobrenadantes se cosecharon y se congelaron. Las partículas virales se liberaron de las células por medio de una descongelación, y el material en bruto obtenido que comprendió los virus se usó para infectar otras células.

Aislamiento del ADN viral a partir de las células infectadas:

El ADN que se empleó en la PCR con especificidad por las ITR se aisló como se detalla a continuación. Las partículas virales se liberaron del material viral en bruto mediante la aplicación de ciclos repetidos de congelación y descongelación. Posteriormente, el ADN de las células huésped se removió por medio de un tratamiento con la ADNasa I. Las partículas virales se destruyeron incubándolas con 10% de SDS y tratándolas con la proteinasa K. El ADN viral se purificó a continuación usando el conjunto de elementos GeneClean Spin (de MP Biochemicals), y luego se lo usó en el análisis basado en la PCR.

Se usó el lisado en bruto para aislar el ADN que se emplearía en el análisis de la secuencia de las ITR. Con este propósito, el ADN se aisló mediante el aislamiento de PEG, a partir de 20 ml del lisado celular en bruto, se sometió a lisis con diversos ciclos consecutivos de congelación y descongelación, y se trató con una ADNasa I (de Roche, a razón de 0.01 mg/ml) y una ARNasa T1 (de Roche, a razón de 10 U/ml) y con una inactivación ulterior con NaCl (1 M). Las partículas virales se precipitaron con PEG 6000 (de BDH iochemical) al 10% en hielo durante 1 hora, después de lo cual se llevó a cabo una centrifugación a 9000 x G. El producto obtenido se suspendió nuevamente en 1 ml de un amortiguador SM (que comprendió NaCl 0.1 M, MgSO₄ 8 mM, Tris HCl 50 mM, pH 7.5, y 0.002% de gelatina). Las proteínas de la cápside de los virus se destruyeron usando SDS al 10% y un tratamiento con la proteinasa K, y el ADN se extrajo sobre la base de una precipitación con fenol y cloroformo. El ADN completo fue digerido con EcoRI (Ad26), con SphI (Ad48, Ad5), con AgeI (Ad49, Ad11) o con NheI (Ad50), y finalmente fue secuenciado en Baseclear, Leiden.

PCR con especificidad por las ITR

Debido a que las regiones de las ITR son ricas en AT, se usaron cebadores que comprendieron ácidos nucleicos fijos (LNA) para asegurar que hubiera suficiente cebador unido al molde. Los cebadores se adquirieron en Eurogentech. Se usaron los cebadores que se detallan a continuación, donde las minúsculas representan los nucleótidos de los LNA. El cebador ori.ITR fue CatcaTcaATAATATACC, SEQ ID N° 6. El cebador para la ITR alternativa de Ad35 fue CtatcTatATAATATACC, SEQ ID N° 7. El cebador inverso para la ITR izquierda de Ad35 fue CTAAGTAGTTCCGTGAGAAAAG, SEQ ID N° 8. El cebador directo para la ITR derecha de Ad35 fue GGTACGTCACATCCCATTAA, SEQ ID N° 9. El cebador inverso para la ITR izquierda de Ad5 fue CACTTTTGCCACATCCGTC, SEQ ID N° 10. El cebador directo para la ITR derecha de Ad5 fue CCCACGTTACGTCCTTC, SEQ ID N° 11. Los productos de la PCR se analizaron en un gel de agarosa.

Cinética de la replicación sobre la base de una qPCR

La cinética de la replicación se analizó infectando células 293 y PER.C6 utilizando 1000 partículas virales por célula durante 3 horas, para luego aplicar un lavado. La presencia de las partículas virales en las células y en el sobrenadante se analizó en el punto de tiempo posterior a la infección que se indica, sobre la base de un procedimiento de VP qPCR. Con este fin, las células infectadas se lisaron con Triton X-100 (de Sigma) al 0.5%, se incubaron a -80°C durante 1 hora y se congelaron.

Se puso en práctica un procedimiento de qPCR con especificidad por el promotor del CMV, que estaba presente en todos los vectores basados en adenovirus que se usaron, mediante el uso de la mezcla maestra para expresar genes de Applied Biosystems, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia de la combinación de cebador y sonda directos para el CMV fue TGGGCGGTAGGCGTGTA, SEQ ID N° 12. La secuencia de la combinación de cebador y sonda inversos para el CMV fue CGATCTGACGGTTCCTAAACG, SEQ ID N° 13. La secuencia de la sonda VIC 5' fue TGGGAGGTCTATATAAGC-MGB-NFQ-3', SEQ ID N° 14. Todas estas secuencias se adquirieron en Applied Biosystems. Para determinar la cantidad de partículas virales que hubo en cada muestra, se generó una curva de calibración.

Alineamiento de las secuencias

Las secuencias de las ITR de los adenovirus se obtuvieron sobre la base de una búsqueda BLAST. El alineamiento se creó con el software CLC. Los alineamientos se basaron en secuencias publicadas. Sin embargo, para algunas de estas secuencias publicadas, todavía no se habían secuenciado específicamente las ITR. En lugar de esto, se asumió que las secuencias se habían conservado entre los subtipos, lo que puede haber dado como resultado una representación excesiva de la secuencia conservada CATCATCA. Cuando hubo diversas secuencias publicadas

para un adenovirus de un serotipo determinado, solamente se las incluyó cuando se observaron diferencias entre ellas en los 8 nucleótidos terminales.

5 Ejemplo 1. *Detección de una secuencia de una ITR alternativa durante la producción de un vector apropiado como vacuna basado en el adenovirus Ad35 en células PER.C6*

10 Para generar un vector basado en Ad35 que fuera útil como vacuna, a partir del cual pudieran expresarse los antígenos Ag85A, Ag85B y TB10.4 de *Mycobacterium tuberculosis*, como los descritos con anterioridad (WO 2006/053871, Radosevic et al., 2007, Infect. Immun., 75: 4105-4115), se transfectaron células PER.C6 con plásmidos linealizados, lo que dio como resultado el virus Ad35.TBS, que podía replicarse en las células PER.C6.

15 Antes de la elaboración, mediante dos purificaciones en placa consecutivas, se aseguró que el virus inicial derivara de un único clon genéticamente estable. La identidad del virus obtenido se caracterizó por medio de una PCR y una transferencia Western en distintas etapas del proceso de elaboración. Más aún, el virus fue secuenciado por completo antes de usarlo como virus inicial en la elaboración a gran escala.

20 La secuencia del genoma fue estable y de esta manera idéntica a la del genoma codificado por los plásmidos de rescate, con la excepción de los 8 nucleótidos terminales de la ITR derecha e izquierda. La secuencia codificada por el plásmido, CATCATCA, que de aquí en adelante se conocerá como la secuencia de la ITR original, sufrió una modificación que dio como resultado la secuencia CTATCTAT, que de aquí en adelante se conocerá como la secuencia de la ITR alternativa. Vale decir, hubo cambios en 6 nucleótidos con relación a la secuencia original del plásmido. Este es un descubrimiento inesperado, ya que los genomas de los adenovirus que se emplean en los vectores que han de usarse como vacunas suelen ser muy estables.

25 Para investigar con mayor detalle la inconsistencia entre las secuencias terminales de las ITR, se secuenciaron las ITR en diversas etapas durante el proceso de elaboración del vector que actúa como vacuna. Con este análisis, se determinó que la secuencia de la ITR original todavía estaba presente cinco pasajes después de la purificación en placas (VPN 5). Sin embargo, también se detectó una secuencia con modificaciones en el pasaje número 5 de un proceso de elaboración diferente, lo cual es indicativo de la presencia de secuencias mixtas. Con la excepción de las modificaciones en los 8 nucleótidos terminales que se han mencionado, la secuencia remanente no presentó inconsistencias. En el VPN 6, se observaron secuencias mixtas, que probablemente comprendieron aproximadamente la misma proporción de la secuencia original y de la secuencia alternativa, la cual se transformó en una secuencia alternativa distinguible en el VPN 7.

35 Ejemplo 2. *Puede observarse heterogeneidad a nivel de las ITR tanto en diversos vectores basados en Ad35 como en el virus salvaje*

40 Para determinar si el fenómeno que se había observado era insignificante y para examinar la frecuencia del cambio de la secuencia de la ITR original, CATCATCA por la secuencia de la ITR alternativa, CTATCTAT, se analizaron cuatro placas que se habían originado en el mismo procedimiento de rescate de virus. Después de realizar una serie de pasajes repetidos, fue posible observar el cambio por la secuencia de la ITR alternativa entre los virus que se propagaron en todas las placas.

45 Además, fue posible observar la presencia de ITR alternativas durante el pasaje de vectores Ad35 a partir de los cuales se expresaban diversos transgenes, independientemente de la presencia de una supresión parcial en el promotor pIX (tabla II).

50 Por otro lado, no solamente se observaron secuencias mixtas entre los vectores que estuvieron basados en Ad35, sino también en el virus Ad35 salvaje, con lo que puede excluirse la posibilidad de que se haya producido un artefacto con el vector.

Ejemplo 3. *La secuencia de la ITR alternativa es estable en Ad35.TBS después de 10 pasajes virales*

55 Para determinar si el cambio por la secuencia de la ITR alternativa es estable durante varios pasajes virales, se construyeron vectores Ad35.TBS que comprendieron ITR con una secuencia original o con una secuencia alternativa, es decir, Ad35.TBS con la ITR original y Ad35.TBS con la ITR alternativa. Estos virus fueron sometidos a una serie de pasajes en células PER.C6 y la secuencia de los 8 nucleótidos terminales de la ITR se monitoreó sometiendo los virus en cada pasaje a un análisis de PCR. Para distinguir la secuencia original de la secuencia alternativa, en la PCR se emplearon conjuntos de cebadores diferentes, con los que pudiera amplificarse de manera específica la secuencia de la ITR original o la secuencia de la ITR alternativa. Mediante el análisis de cada pasaje viral, se determinó que hubo una disminución en la proporción de la secuencia original entre el VPN 3 y el VPN 6. En el caso del vector Ad35.TBS que comprendió la ITR original, la secuencia alternativa surgió durante el VPN 6 (figura 1A) y se conservó durante los 4 pasajes restantes (figura 1A). Durante los 10 pasajes virales que se realizaron con el vector Ad35.TBS que comprendió la ITR alternativa, que había sido creado de manera artificial, con la PCR solamente pudo detectarse la secuencia alternativa (figura 1B), con lo que pudo excluirse que hubiera ocurrido una reversión a la secuencia original o que esta parte del genoma hubiera sido generalmente inestable.

Por otra parte, la presencia de vectores Ad35 completamente idénticos, con la excepción de la presencia de ITR con secuencias originales o alternativas, también dio como resultado un desarrollo superior para la secuencia de la ITR alternativa, lo que es indicativo de que esta secuencia presenta una ventaja a nivel de crecimiento sobre la secuencia de la ITR original.

5 Debido a que se detectó el cambio de la secuencia de la ITR original por la secuencia de la ITR alternativa en Ad35, que es un vector del grupo B, también se analizaron vectores Ad5 vacíos con la ITR original y con la ITR alternativa (Ad5 es un vector del grupo C). En contraste con los resultados que se obtuvieron con el vector Ad35, el vector Ad5 no presentó cambios en la secuencia de la ITR. Por el contrario, en él se conservaron las ITR originales durante 10 pasajes virales (figura 1C). Sin embargo, tal como se ilustra en el ejemplo 8 más adelante, después de una mayor cantidad de pasajes con el vector Ad5, también fue posible hallar una secuencia alternativa. Más aún, los vectores Ad5 que se generaron de manera artificial, que comprendieron ITR alternativas, fueron estables durante 10 pasajes virales y no presentaron reversiones a la secuencia de la ITR original (figura 1D).

15 *Ejemplo 4. Un vector Ad35 que comprende la secuencia de la ITR alternativa puede inducir un CPE posterior a la infección antes que un vector Ad35 que comprende la ITR original*

Debido a que se había observado un desarrollo superior entre los virus Ad35 que comprendían ITR alternativas en sus genomas, se asumió que éstas conferían ventajas a nivel de la replicación, en comparación con las ITR originales. Para confirmar esto, se analizó la cinética del crecimiento de diversos virus Ad35 que comprendían ITR con secuencias originales o alternativas. Debido a que el CPE que se induce con una infección de adenovirus en líneas complementarias que comprenden la región E1 es una indicación apropiada de la velocidad de la replicación, se infectaron primero células 293 y se observó el efecto citopático 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección, con una MOI de 100 ó 1000 partículas virales por célula. 24 horas después de la infección, no se observó CPE alguno con ninguna de las MOI que se han mencionado. Sin embargo, 48 horas después de la infección, fue posible observar un CPE avanzado para el vector Ad35.dE1 que comprendió la ITR alternativa, con cualquiera de las MOI. 96 horas después de la infección, se desarrolló un CPE completo. En contraste, solamente se observó un CPE limitado para el vector Ad35.dE1 que comprendió la ITR original en los puntos de tiempo posteriores a la infección que se han indicado.

30 *Ejemplo 5. La secuencia de la ITR alternativa le confiere una ventaja a nivel de la replicación al genoma*

Con el propósito de cuantificar la diferencia sospechada en la cinética de la replicación, se utilizó un análisis de qPCR para determinar la replicación del genoma en diversos puntos de tiempo posteriores a la infección. Más específicamente, se infectaron células 293 con 1000 partículas virales por célula, se las lisó y se las sometió a un análisis de qPCR, mediante el uso de un ensayo TaqMan que había sido concebido para detectar el promotor CMV, que estaba presente en el vector viral. En la figura 2 puede observarse que, si bien los vectores Ad35 que comprendieron la ITR original y la ITR alternativa alcanzaron una titulación idéntica, de aproximadamente 10^{10} partículas virales por ml, en el último punto de tiempo que se analizó (90 horas después de la infección), el vector Ad35 que comprendió la ITR original presentó un crecimiento demorado. En los primeros puntos de tiempo posteriores a la infección, el vector Ad35 que comprendió la ITR alternativa se caracterizó por una curva de amplificación del genoma más pronunciada, de modo que la fase estacionaria se alcanzó más temprano que en el caso del vector Ad35 que comprendió la ITR original (figura 2A). En contraste, la cinética de la replicación del vector Ad5 fue idéntica, independientemente de la presencia de una ITR alternativa u original (figura 2B).

La ventaja a nivel de la replicación del genoma que se observó para el vector Ad35 que comprendió la ITR alternativa, en contraste con el vector Ad5 que comprendió la ITR alternativa, se corroboró en células PER.C6 (figuras 2C-D), donde originalmente se había determinado que la versión alternativa del genoma presentaba un desarrollo superior.

50 *Ejemplo 6. La secuencia de la ITR alternativa está representada en secuencias publicadas de adenovirus humanos*

Se determinó si la secuencia de la ITR alternativa también estaba presente en secuencias publicadas de adenovirus. Con este propósito, se alinearon los nucleótidos 1-8 de diversas ITR humanas y no humanas publicadas. Los virus humanos comprendieron predominantemente la secuencia original, CATCATCA, por lo que se los clasificó como poseedores de "secuencias humanas conservadas" (tabla I).

Adicionalmente, se identificaron secuencias que diferían de la secuencia CATCATCA en 1-6 nucleótidos, y se las denominó "secuencias variables de los adenovirus humanos". La secuencia predominante entre las "secuencias variables" fue la secuencia alternativa CTATCTAT, que también había sido identificada durante el pasaje de los vectores derivados de Ad35. Mediante el alineamiento de las secuencias no humanas (tabla I), se demostró que la secuencia CATCATCA es la más frecuente. Una vez más, fue posible hallar secuencias alternativas, por ejemplo, la secuencia alternativa GATGATGT, que se había identificado con anterioridad en adenovirus aviares. La mayoría de las secuencias publicadas de las ITR fueron consistentes con el modelo de la replicación de Jong (de Jong et al., 2003, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 272: 187-211; King y van der Vliet, 1994, EMBO J., 13: 5786-5792), donde hay

una repetición pequeña, de dos, tres o cuatro nucleótidos, que es imprescindible para el mecanismo de regresión que ocurre durante el inicio de la replicación.

En la tabla I se detallan secuencias publicadas de ITR que no pueden proveer una representación equilibrada de las secuencias de ITR naturales. En algunos casos, los nucleótidos terminales de las ITR no han sido secuenciados, y simplemente se asume que son CATCATCA. Adicionalmente, antes de la secuenciación, los adenovirus pueden desarrollarse a partir de muestras de diagnóstico, durante varios ciclos de replicación, lo que puede dar como resultado cambios a nivel de los nucleótidos. Independientemente de esto, vale destacar que la secuencia original CATCATCA puede detectarse en la naturaleza incluso después de un período prolongado de evolución concurrente entre el virus y el huésped, por lo que la secuencia alternativa CTATCTAT podría resultar más beneficiosa en un cultivo de células que bajo condiciones naturales.

Ejemplo 7. Los pasajes repetidos dan como resultado un cambio en la secuencia de la ITR en diversas líneas de células

Para descartar la posibilidad de que el cambio de la secuencia de la ITR original por la secuencia de la ITR alternativa que se había observado fuera un fenómeno propio de la línea de células complementarias que comprendían la región E1, que era la línea de células que se había empleado en el proceso de producción, se realizaron pasajes con un virus Ad35 salvaje que comprendía la secuencia de la ITR original, CATCATCA, en diversos tipos de células. El rescate de Ad35, por tanto, se llevó a cabo usando plásmidos que comprendían el genoma salvaje completo de Ad35, en células A549, HEK293, PER.C6, Hep2, HeLa y MRC5, que fueron seleccionadas como representantes de una amplia variedad de tipos celulares, ya que se trata de líneas de células que derivan de diversos tejidos, tales como el epitelio o los fibroblastos, que se originan en carcinomas o que presentan orígenes diferentes, y que se caracterizan por diversos niveles de ploidía (tabla III).

Sobre la base de los resultados que se detallan en la tabla III, puede concluirse que hubo un cambio por la ITR alternativa en el VPN 10 entre las líneas de células asistentes HEK293 y PER.C6, aunque, en pasajes posteriores, también se observó un cambio o una combinación a nivel del fenotipo de las otras líneas de células que se analizaron.

Ejemplo 8. Un pasaje extendido da como resultado heterogeneidad a nivel de las ITR o un cambio completo por la secuencia de la ITR alternativa en la mayoría de los vectores basados en adenovirus que se analizaron

Se analizó la frecuencia del cambio por la secuencia alternativa CTATCTAT en vectores basados en adenovirus de diversos serotipos. En este contexto, se sometieron los vectores basados en adenovirus Ad26, Ad48, Ad49, Ad11(a), Ad50 y Ad5 a una serie de pasajes en células PER.C6, que se prolongaron hasta el VPN 15 después de la purificación en placas y se llevaron a cabo análisis de secuenciación en el VPN 10 y en el VPN 15. Se incluyeron dos transgenes diferentes en los vectores de cada serotipo para excluir adicionalmente la posibilidad de que el efecto pudiera deberse a un transgén diferente.

Los resultados de este conjunto de experimentos se proveen en la tabla IV. Sorprendentemente, en todos los vectores que se analizaron, con la excepción de Ad48, se determinó que se produjo un cambio por la secuencia de la ITR alternativa o la adquisición de un fenotipo mixto, lo cual podría ser una indicación de una conversión en un pasaje viral ulterior. De manera consistente con lo que se había observado con anterioridad para Ad5, la secuencia de la ITR original se conservó hasta el VPN 10, sin embargo, fue posible observar una mezcla a partir del VPN 15. En contraste, los vectores derivados de Ad48 fueron los únicos en los que se conservó la secuencia de la ITR original hasta el VPN 15.

En cualquier caso, de acuerdo con la invención, para obtener un mayor margen de seguridad, se sugiere introducir ITR con secuencias alternativas en todos los adenovirus recombinantes, incluso en aquellos basados en Ad5 o en Ad48. De esta manera, podrá prevenirse el desarrollo potencial de heterogeneidad en los lotes, a causa de las mutaciones eventuales en los extremos del genoma que puedan ocurrir durante el cultivo de grandes volúmenes o después de una gran cantidad de pasajes. De esta manera, los genomas de esencialmente todas las partículas de los adenovirus recombinantes en los lotes que se obtengan comprenderán la secuencia CTATCTAT de acuerdo con la invención en el extremo 5'. Más aún, cuando se rescaten vectores basados en adenovirus que comprendan una ITR con una secuencia alternativa como la que se ha mencionado, podrá acelerarse el proceso de producción de vectores que actúan como vacuna.

Tabla I. Secuencias de los extremos 5' de adenovirus de diversos serotipos

A. Secuencias humanas

Secuencias humanas conservadas					
AdV humano 5	L43079	CAT	CAT	CA	C

ES 2 582 504 T3

AdV humano 2	ADRCG	D
AdV humano 1	AF534906	
AdV humano 6	FJ349096	
AdV humano 57	HQ003817	
AdV humano 17	HQ910407	
AdV humano 19	AB448774	
AdV humano 22	FJ619037	
AdV humano 26	EF153474	
AdV humano 28	FJ824826	
AdV humano 36	GQ384080	
AdV humano 36	DQ900900	
AdV humano 46	AY875648	
AdV humano 48	EF153473	
AdV humano 49	DQ393829	
AdV humano 53	AB605244	
AdV humano 54	AB448770	
AdV humano 56	HM770721	
AdV humano 3	AY599836	B
AdV humano 7	AY601634	
AdV humano 11a	FJ597732	
AdV humano 14	AY803294	
AdV humano 34	AY737797	
AdV humano 35	AY128640	
AdV humano 55	FJ643676	
AdV humano 4	AY599837	E
AdV humano 40	L19443	F
AdV humano 41	DQ315364	
AdV humano 31	AM749299	A
AdV humano 18	ADRP11T1	

Secuencias humanas variables					
AdV humano 10	ADRJITR-1	.T.	D
AdV humano 19	ADRITRAA	..A	T.A	T.	
AdV humano 8	AB448769	.TA	TC.	AT	
AdV humano 29	AB562587	.TA	TC.	AT	

ES 2 582 504 T3

AdV humano 53	AB605246	.TA	TC.	AT	B
AdV humano 15	AB562586	.TA	TC.	AT	
AdV humano 37	AF271992	.TA	TC.	AT	
AdV humano 9	AF099665	.TA	TC.	AT	
AdV humano 3	DQ086466	.TA	TC.	AT	
AdV humano 7	HQ659699	.TA	TC.	AT	
AdV humano 7	AY495969	.TC	TC.	AT	
AdV humano 16	AY601636	...	T..	.T	
AdV humano 21	AY601633	.TA	TC.	AT	
AdV humano 50	AY737798	.A	TCA	AT	
AdV humano 4	AY458656	.TC	TC.	.T	E
AdV humano 4	AY594253	.TA	TC.	AT	
AdV humano 41	HM565136	G.G	TG.	TG	F
AdV humano 18	GU191019	.C.	ATC	T.	A
AdV humano 12	AC_000005	.C.	ATC	T.	
	Consenso	CAT	CAT	CA	

B. Secuencias no humanas

AdV de simio 48	FJ025929	CAT	CAT	CA	Mast-AdV
AdV de simio 29	FJ025916	
AdV de simio 28.1	FJ025914	
AdV de simio 41.1	FJ025913	
AdV de simio 32	FJ025911	
AdV de simio 46	FJ025930	
AdV de simio 27.1	FJ025909	
AdV de simio 33	FJ025908	
AdV de simio 35.1	FJ025912	
AdV de simio 44	FJ025899	
AdV de simio 31.1	FJ025906	
AdV de simio 42.1	FJ025903	
AdV de simio 40.1	FJ025907	
AdV de simio 34	FJ025905	
AdV de simio 45	FJ025901	
AdV de simio 43	FJ025900	
AdV de simio 50	HQ241820	

ES 2 582 504 T3

AdV de simio 49	HQ241819	
AdV de simio SA7P	X01027	
AdV de simio 8	ADRITR1	
AdV de simio 7	DQ792570	
AdV de simio 1	AY771780	
AdV de simio 30	FJ025920	
AdV de simio 23	AY530877	
AdV de simio 39	FJ025924	
AdV de simio 22	AY530876	
AdV de simio 36	FJ025917	
AdV de simio 26	FJ025923	
AdV de simio 37.2	FJ025919	
AdV de simio 24	AY530878	
AdV de simio 36	FJ025917	
AdV de simio 25	FJ025918.1	
AdV de simio 25	AF391496	.C.	TC.	TC	
AdV de simio 21	AC000010	.CA	TCA	TC	
AdV equino 1	AEEADITR1	
AdV porcino 3	AF083132	
AdV porcino 5	AF221544-1	
AdV bovino 2	AF252854-1	
AdV bovino 1	ADRITRB	
AdV bovino 3	AF030154	
AdV bovino 4	AF036092	...	TCA	T.	
AdV bovino 5	AF238881	...	TCA	T.	
AdV bovino 10	AF238882	
AdV canino 2	CAU77082	
AdV canino 1	AC_000003	
AdV murino 1	ADRITRRA	
AdV murino 3	EU835513	
AdV murino 2	NC_014899	.T.	.T.	..	
AdV de arbusto	AF258784	
<i>Mastadenovirus</i>	ADRFGRG	G..	G..	GT	
AdV ovino 7	OAU40839	.TA	TTC	AT	
AdV de pavo A	AC_000016	..A	TCA	AT	Si-AdV

ES 2 582 504 T3

AdV de pavo A	AC_000016-1	..A	TCA	AT	Avi-AdV
AdV de pavo 1	NC_014564T	
AdV de sapo 1	NC_002501	..A	TCA	AT	
AdV aviar 1	AAU46933	G..	G..	GT	
AdV aviar 1	AY421750S1T	
AdV aviar 1	AY421750S2	...	A.C	.G	
AdV aviar C	NC_015323T	
AdV aviar 9	AF083975T	
AdV aviar E	NC_014969T	
AdV de pato A	AC_000004	.TC	ATG	TC	At-AdV
	Consenso	CAT	CAT	CA	

Tabla II. ITR de diversos virus rAd35 después de un pasaje

Virus	Promotor pIX	Tamaño del genoma (kbp)	PP N°	ITR
Ad35.TBS	+	32.4	2	Mixta
Ad35.Ebo.GP.Z	+	32.4	2	Alternativa
Ad35.Ebo.GP.S/G	+	32.4	2	Mixta
Ad35.CS	+	31.5	1	Mixta
Ad35.CS	-	31.3	1	Original
Ad35.Luc	+	32.0	1	Mixta
Ad35.Luc	-	31.9	1	Mixta
Ad35.eGFP	+	31.1	1	Mixta
Ad35.eGFP	-	30.9	1	Mixta
Ad35 vacío	+	30.4	1	Alternativa
Ad35 vacío	-	30.2	1	Alternativa
Ad35.SIV-Gag	+	31.9	1	Alternativa
Ad35 salvaje	NA	34.8	1	Mixta

Tabla III. Cambio de la ITR en diversas líneas de células

Ad35wt	Tipo de célula	Origen	Ploidía	VP10	VP15
HEK293	E1 asistente, riñón	Epitelial	Diploide	Alternativa	-
PER.C6	E1 asistente, retina	Epitelial	Hipotripleide	Alternativa	-
A549	Carcinoma de pulmón	Epitelial	Hipotripleide	Mixta	Mixta
HeLa	Adeno-carcinoma de cuello cervical	Epitelial	Hipotripleide	-	Alternativa

ES 2 582 504 T3

Hep2	Conta-minante de HeLa	Epitelial	Diploide	Original	Mixta
MRC5	Pulmón normal	Fibroblastos	Diploide	-	Mixta

Tabla IV. Cambio de la ITR en diversos vectores

Vector	Subgrupo	VPN 10	VPN 15
Ad26.eGFP	D	Mixta	Alternativa
Ad26.Luc	D	Mixta	Alternativa
Ad48.eGFP	D	Original	Original
Ad48.Luc	D	Original	Original
Ad49.eGFP	D	Alternativa	ND
Ad49.Luc	D	Mixta	Alternativa
Ad11.Env	B	Alternativa	ND
Ad11.SivGag	B	Alternativa	ND
Ad50.eGFP	B	Alternativa	ND
Ad50.Luc	B	Mixta	Alternativa
Ad5.eGFP	C	Original	Mixta
Ad5.Luc	C	Original	Mixta

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Crucell Holland B.V.
 Vellinga, Jort
 Custers, Jerome

<120> Lotes de adenovirus recombinantes con extremos alterados

10 <130> 0198 EP P00 PRI
 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

25 <400> 1
 gtgactggtg agtactc 17

<210> 2
 <211> 16
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 2
 gaccacctag gctgac 16

<210> 3
 40 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> cebador

<400> 3
 ttaattaatc gatctatcta tataatatac cttatag 37

50 <210> 4
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 60 gatctatcta tataatatac cttatagatg gaatgg 36

<210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

ES 2 582 504 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 5
 5 attatataka tagatcgatt aattaattcg aacct 35

 <210> 6
 <211> 18
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 15
 <400> 6
 catcatcaat aatatacc 18

 <210> 7
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 25
 <400> 7
 30 ctatctatat aatatacc 18

 <210> 8
 <211> 22
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 40
 <400> 8
 ctaagtagtt ccgtgagaaa ag 22

 <210> 9
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 50
 <400> 9
 ggtacgtcac atcccattaa 20

 <210> 10
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 60
 <400> 10
 65 cacttttgcc acatccgctc 19

ES 2 582 504 T3

5 <210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 11
cccacgttac gtcacttc 18

15 <210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 12
tgggcgtag gcgtgta 17

25 <210> 13
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

35 <400> 13
cgatctgacg gttcactaaa cg 22

40 <210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

45 <400> 14
tgggaggtct atataagc 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende partículas de adenovirus recombinante, donde el adenovirus recombinante comprende un transgén y es un adenovirus humano recombinante de serotipo 5, 11a, 26, 34, 35, 49 ó 50 o un adenovirus de simio recombinante, caracterizada por que los genomas de al menos 99% de las partículas de adenovirus en dicha composición comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.
- 10 2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el adenovirus recombinante es un adenovirus humano recombinante de serotipo 5, 26, 35, 49 ó 50.
- 15 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, donde el adenovirus recombinante es un adenovirus humano recombinante de serotipo 26 ó 35.
4. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual es una composición farmacéutica.
- 20 5. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el adenovirus recombinante carece de al menos una porción de la región E1.
6. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos 1×10^7 , preferiblemente al menos 1×10^8 , preferiblemente al menos 1×10^9 y preferiblemente al menos 1×10^{10} partículas de adenovirus recombinante.
- 25 7. Un método para preparar un lote de partículas de adenovirus recombinante, donde los genomas de al menos 99% de las partículas de adenovirus en el lote comprenden secuencias de nucleótidos idénticas en los extremos 5' y donde el adenovirus comprende un transgén, comprendiendo el método:
- 30 a) poner en práctica un paso de clonación molecular para cambiar los extremos 5' de origen natural del genoma de un adenovirus que no sean CTATCTAT por extremos 5' alterados que como nucleótidos terminales comprendan la secuencia de nucleótidos CTATCTAT;
- b) propagar el adenovirus recombinante que comprende los extremos 5' alterados en células huésped; y
- 35 c) cosechar el adenovirus recombinante para obtener un lote de partículas de adenovirus recombinante, donde los genomas de al menos 99% de las partículas de adenovirus en el lote comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.
8. Un método para preparar un lote de partículas de adenovirus recombinante, donde los genomas de al menos 99% de las partículas de adenovirus en el lote comprenden secuencias de nucleótidos idénticas en los extremos 5' y donde el adenovirus comprende un transgén, comprendiendo el método:
- 40 a) poner en práctica un procedimiento para purificar un adenovirus en una placa, donde el adenovirus recombinante es un adenovirus humano recombinante de serotipo 5, 11a, 26, 34, 35, 49 ó 50 o un adenovirus de simio recombinante, de manera tal de aislar un adenovirus o adenovirus recombinante, a partir de una única placa, donde dicho adenovirus o dicho adenovirus recombinante comprende la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5' de su genoma;
- 45 b) propagar un adenovirus recombinante que se obtuvo a partir de una única placa en el paso a) en células huésped; y
- c) cosechar el adenovirus recombinante para obtener un lote de partículas de adenovirus recombinante, donde los genomas de al menos 99% de las partículas de adenovirus en el lote comprenden la secuencia de nucleótidos CTATCTAT como nucleótidos en el extremo 5'.
- 50 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, donde el lote comprende al menos 1×10^7 partículas de adenovirus recombinante.
- 55 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el adenovirus recombinante es un adenovirus humano recombinante de serotipo 5, 26, 35, 49 ó 50.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde el adenovirus recombinante es un adenovirus humano recombinante de serotipo 26 ó 35.
- 60 12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde el adenovirus recombinante carece de al menos una porción de la región E1.
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que también comprende purificar el adenovirus recombinante.

14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, que también comprende formular el adenovirus recombinante en una composición farmacéutica.

5 15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-14, donde el paso b) se lleva a cabo en un biorreactor.

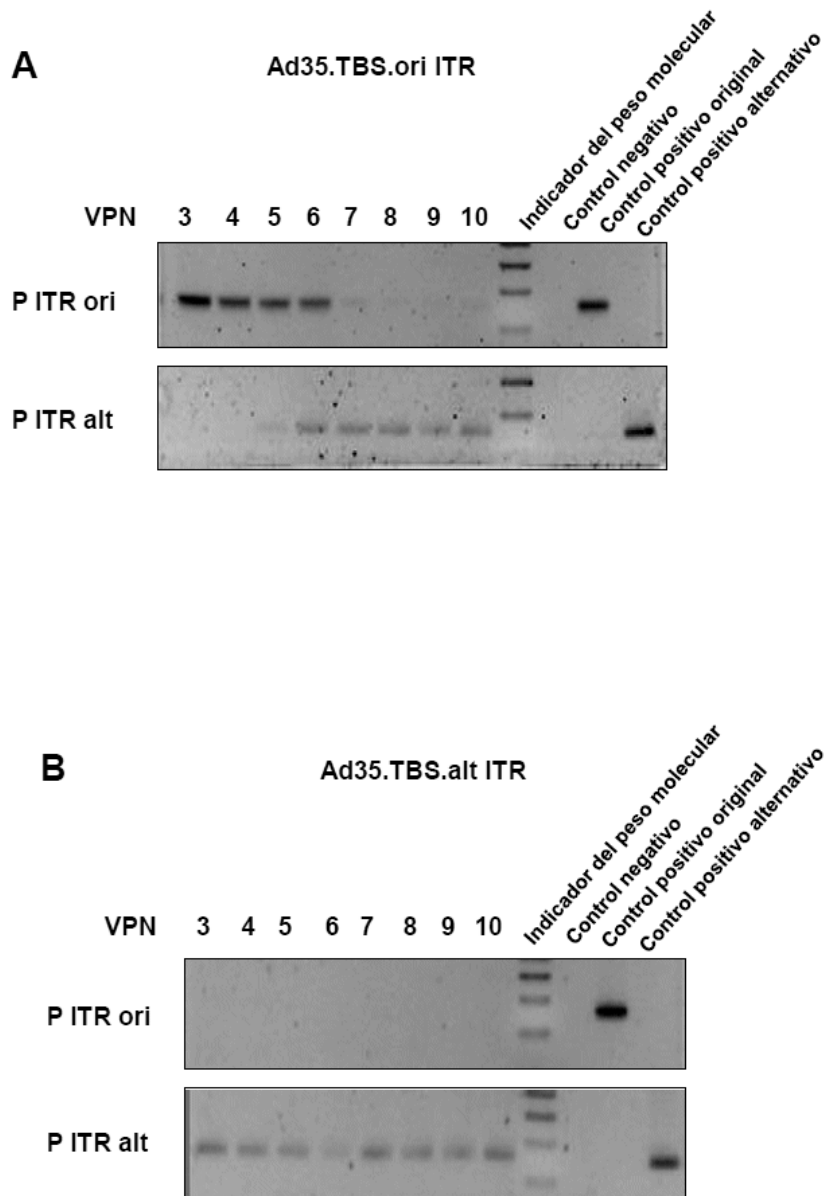


Fig. 1

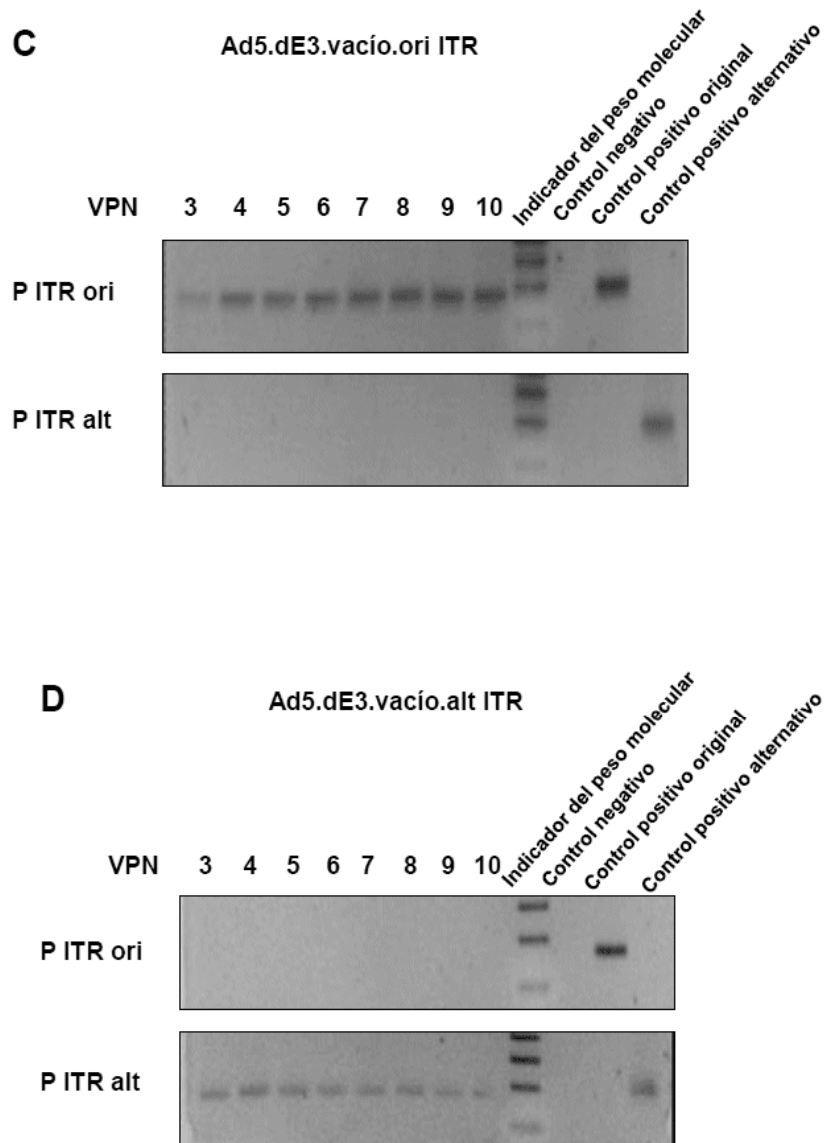


Fig. 1, cont.

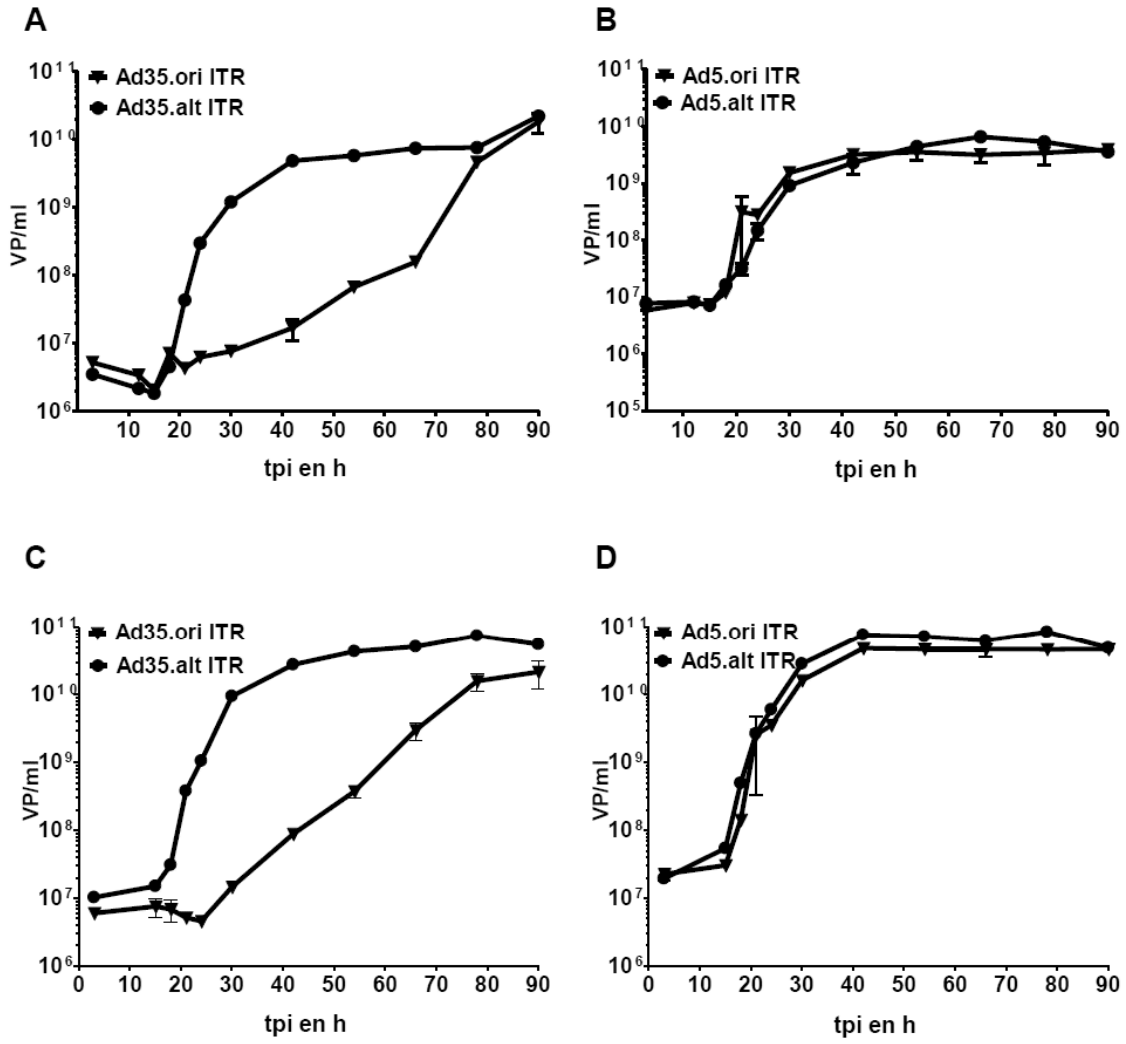


Fig. 2