



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 337 973**

⑫ Número de solicitud: 200801434

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫② Fecha de presentación: **16.05.2008**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2010**

Fecha de la concesión: **18.01.2011**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **28.01.2011**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.01.2011

⑦③ Titular/es:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
c/ Etxesakan, 28 - Oficina 5 Planta Baja
31180 Cizur Mayor, Navarra, ES

⑦② Inventor/es: **González Aparicio, Manuela;**
Mauleón Mayora, Miren Itsaso y
Hernández Alcoceba, Rubén

⑦④ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤④ Título: **Adenovirus auxiliares auto-inactivantes para la producción de adenovirus recombinantes de alta capacidad.**

⑤⑦ Resumen:

Adenovirus auxiliares auto-inactivantes para la producción de adenovirus recombinantes de alta capacidad. La invención se relaciona con reactivos y métodos para la obtención de adenovirus auxiliares auto-inactivantes que, permiten el desarrollo de sistemas de generación de adenovirus recombinantes de alta capacidad en células y que reducen al máximo la contaminación de dichos adenovirus de alta capacidad por adenovirus auxiliares.

ES 2 337 973 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Adenovirus auxiliares auto-inactivantes para la producción de adenovirus recombinantes de alta capacidad.

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se encuadra en el campo de los vectores adenovirales y, más concretamente, en el campo de los sistemas de producción de vectores adenovirales de tercera generación o *gutless* mediante el uso de adenovirus auxiliares auto-inactivantes que permiten la generación en células de adenovirus recombinantes con una mínima contaminación de los adenovirus de alta capacidad por adenovirus auxiliares.

Antecedentes de la invención

Los adenovirus de alta capacidad (HC-Ad), conocidos también como adenovirus *gutless* o adenovirus auxiliar-dependientes, tienen un gran atractivo como vectores para terapia génica porque mantienen la alta eficiencia de transducción y el tropismo de los demás vectores adenovirales tanto en roedores como en primates, pero evitan la inmunogenicidad asociada a la expresión de proteínas virales en las células infectadas. Además estos vectores virales tienen una gran capacidad para insertar un transgén de interés (hasta aproximadamente 36 Kb), muy superior a la de otros vectores virales.

Los vectores adenovirales de alta capacidad están basados en adenovirus a los que se les han “vaciado” todas las secuencias virales codificantes. Estos vectores tienen como requerimientos mínimos las regiones terminales del genoma adenoviral (ITR, *inverted terminal repeats*) que son necesarios para la replicación viral, y la señal de empaquetamiento (ψ), que también actúa en *cis*.

Dado que los adenovirus de alta capacidad carecen de todas las regiones virales codificantes, requieren para ser propagados de la presencia de un virus auxiliar (*helper*) delecionado en la región El, que proporciona las proteínas virales en *trans*. La propagación se lleva a cabo mediante co-transfección o co-infección en líneas celulares 293, en las que se ha integrado la región El delecionada en el virus auxiliar.

Sin embargo, con este sistema de propagación se generan también partículas virales indeseables que encapsidan genomas de virus auxiliar y contaminan las preparaciones finales de los adenovirus de alta capacidad. La acumulación de virus auxiliar es muy variable, pero en ocasiones puede ser tan intensa que desplaza al propio virus de alta capacidad, siendo este uno de los motivos por los que los métodos actuales de producción no tienen la Habilidad necesaria para su uso clínico. El rendimiento es otro factor limitante, en parte relacionado también con el problema de la aparición de virus auxiliar. Hasta la fecha se han desarrollado y descrito diferentes sistemas para disminuir la eficiencia de empaquetamiento del virus auxiliar. En general, estos sistemas están basados en la incorporación de mutaciones en la señal de empaquetamiento del virus auxiliar, en el aumento del tamaño de su genoma, y más particularmente en una eliminación específica de la señal de empaquetamiento durante el procedimiento de producción viral.

Parks y cols. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:13565-13570) han descrito métodos para la eliminación de la señal de empaquetamiento ψ del virus auxiliar mediante un sistema de recombinación Cre-loxP, en el que la señal ψ de dicho virus está flanqueada por sitios loxP. Si la propagación se lleva a cabo en células 293 que expresan la recombinasa Cre, la recombinasa escinde la señal ψ del virus auxiliar, impidiendo que pueda ser empaquetado, pero de manera que retiene las secuencias codificantes necesarias para el empaquetamiento del adenovirus de alta capacidad. Alternativamente, US7045347 y Ng *et al.* (*Mol Ther* 2001; 3: 809-815) han descrito sistemas de inactivación del virus auxiliar basado en virus auxiliares cuya secuencia de empaquetamiento se encuentra flanqueada por sitios *frit* de reconocimiento de la recombinasa FLP, de forma que la propagación del virus auxiliar en células 293 que expresan la recombinasa FLP de levaduras resulta en la escisión de la secuencia de empaquetamiento.

Estos sistemas tienen la desventaja de que la reacción catalizada por la recombinasa es bidireccional con lo que la secuencia de empaquetamiento puede volver a reintroducirse en el genoma del virus auxiliar. Para evitar este problema, Groth y cols. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97:5995-6000) han propuesto la utilización de una recombinasa unidireccional, en particular la recombinasa PhiC31, utilizando las secuencias attB/attP de reconocimiento específico para flanquear la señal ψ . Cuando la recombinasa PhiC31 escinde la secuencia flanqueada por los sitios attB/attP, modifica las secuencias de reconocimiento y la convierte en secuencias attR/attL evitando que vuelva a producirse el reconocimiento (con reintroducción de la señal ψ).

Sin embargo, todos los métodos se enfrentan al problema de que la eliminación de las secuencias de empaquetamiento del virus auxiliar requiere de la expresión de una recombinasa a partir de su secuencia codificante localizada en el genoma de la célula hospedadora. Dicho proceso ocurre en un momento del ciclo viral en el que la expresión de proteínas celulares se inhibe parcialmente a causa de los efectos citopáticos asociados a la infección por los adenovirus, por lo que es posible que no se alcancen niveles intracelulares de recombinasa lo suficientemente elevados para eliminar todas las copias de adenovirus auxiliar.

Así, se han propuesto métodos alternativos para impedir la generación de adenovirus auxiliares con capacidad de empaquetarse o, cuando menos, para retrasar la formación de estos con respecto a la formación de los vectores *gutless*. Así, WO2007125146 describe una variante del método descrito anteriormente en el que los vectores adenovirales

auxiliares comprenden una secuencia attB del fago Φ C31 entre la secuencia de empaquetamiento y el ITR más próximo a dicha secuencia de empaquetamiento. La inclusión de dicho sitio attB resulta, aún en ausencia de recombinasa Φ C31, en un retraso en el empaquetamiento de los adenovirus auxiliar con respecto a los adenovirus *gutless*, lo que provoca una disminución de la cantidad de adenovirus auxiliar contaminantes en la preparación de virus *gutless*. Sin embargo, este método únicamente resulta en un retraso en la formación de los adenovirus auxiliares pero no impide la formación de adenovirus auxiliar con capacidad de empaquetamiento.

Este problema se ha resuelto mediante el sistema adenoviral descrito en DE10159167. En este sistema, la recombinasa está codificada por el adenovirus *gutless* y el adenovirus auxiliar contiene sitios diana de reconocimiento para la recombinasa que delimitan una región que comprende la señal de empaquetamiento y cuya eliminación resulta en que el gen adenoviral E1, presente en el adenovirus auxiliar en sentido 3' con respecto a un silenciador de la expresión, queda en proximidad con un promotor AAV p5 de la transcripción. De esta manera, en presencia del adenovirus *gutless*, la recombinasa elimina la región de empaquetamiento del genoma del adenovirus auxiliar a la vez que permite la expresión del gen E1, necesario para el empaquetamiento del adenovirus *gutless*. Sin embargo, este sistema adenoviral incluye un virus auxiliar que expresa E1 por lo que es un virus replicativo y, por tanto, más peligroso que un virus auxiliar convencional. Además, el virus *gutless* expresa la recombinasa, lo que no es deseable en un vector terapéutico con potencial uso clínico.

Otra solución alternativa para evitar la dependencia de la recombinasa procedente de la célula empaquetadora es el uso de una recombinasa codificada por el propio virus auxiliar. Así, US20020072120 describe vectores adenovirales auxiliares que codifican una proteína de fusión formada por la recombinasa Cre y el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos, estando dicha proteína de fusión codificada por una secuencia que se encuentra bajo el control operativo de un promotor constitutivo. La proteína de fusión Cre-ER solo se transloca al núcleo y ejerce su actividad recombinasa en presencia de un estrógeno o análogo, con lo que se elimina la necesidad de usar una célula que exprese la recombinasa a la vez que se evita el efecto tóxico de la recombinasa puesto que se puede regular su actividad mediante la adición de estrógenos al medio de cultivo.

Por tanto, existe una necesidad en la técnica de sistemas de empaquetamiento de vectores adeno virales que eliminen las desventajas de los sistemas conocidos hasta la fecha, en particular, métodos en los que se reduzca al máximo la generación de adenovirus auxiliares durante la propagación del adenovirus *gutless*.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que comprende:

- a) una región que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde dicha región se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible y
- b) una región esencial para la replicación y/o el empaquetamiento del genoma adenoviral flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas para la recombinasa codificada por la secuencia a) en donde dichas secuencias de reconocimiento se encuentran orientadas de forma que se produzca la escisión de dicha región esencial en presencia de dicha recombinasa.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la invención.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con una partícula adenoviral que comprende la secuencia de un polinucleótido de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con sistema para la replicación y empaquetamiento de un adenovirus auxiliar autoinactivante, que comprende:

- a) un polinucleótido, un vector de expresión o una partícula adenoviral según la invención; y
- b) una célula eucariota.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la obtención de un adenovirus auxiliar autoinactivante que comprende

- (i) contactar una célula con un polinucleótido, un vector de expresión o una partícula adenoviral de la invención y, opcionalmente, con uno o varios polinucleótidos que codifican las proteínas adenovirales necesarias para el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula del genoma adenoviral o del polinucleótido que comprende dicho genoma,

- (ii) mantener la célula en condiciones adecuadas para permitir el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula y para impedir la expresión de la recombinasa específica de sitio y
- (iii) recuperar los adenovirus del medio.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un adenovirus auxiliar obtenido según el método del párrafo anterior.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido, de un vector o de una partícula adenoviral según la invención para la producción y empaquetamiento de adenovirus de alta capacidad.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema para la producción de un adenovirus recombinante de alta capacidad que comprende

- (a) un polinucleótido, un vector de expresión o una partícula adenoviral según la invención;
- (b) un adenovirus cuyo genoma comprende un gen de interés y que carece de la secuencia que codifica al menos una de las proteínas esenciales para la replicación o de la secuencia que codifica al menos una de las proteínas esenciales para el empaquetamiento de dicho adenovirus o con un polinucleótido que comprende el genoma de dicho adenovirus y
- (c) una célula eucariota.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la generación de adenovirus de alta capacidad que expresa un gen de interés que comprende las etapas de

- (i) contactar una célula con un adenovirus en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula del genoma de dicho adenovirus o del polinucleótido que comprende dicho genoma,
- (ii) contactar dicha célula con un segundo componente seleccionado del grupo de:

- (a) un polinucleótido que comprende:
 1. una región que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde dicha región se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible y
 2. una señal de empaquetamiento adenoviral ψ flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas para la recombinasa codificada por la secuencia a) en donde dichas secuencias de reconocimiento se encuentran orientadas de forma que se produzca la escisión de la señal de empaquetamiento ψ en presencia de dicha recombinasa,

- (b) un vector adenoviral que comprende un polinucleótido según (a) y

- (c) una partícula adenoviral que comprende un polinucleótido según (a)

en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula de dicho polinucleótido, de dicho vector adenoviral o del genoma de dicha partícula adenoviral,

- (iii) mantener la célula en condiciones adecuadas para la expresión de las proteínas codificadas por los genomas de ambos virus, para la replicación de los genomas de ambos adenovirus y para la expresión de la recombinasa codificada por el polinucleótido, vector o adenovirus usado en la etapa (ii) y
- (iv) recuperar el adenovirus de alta capacidad del cultivo de las células.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. *Esquema de funcionamiento del adenovirus auxiliar auto-inactivable*. En el panel A se muestra el método clásico basado en la producción de Cre por parte de la célula empaquetadora. En condiciones de intensa replicación viral, la expresión de Cre puede ser insuficiente para escindir la secuencia de empaquetamiento de un número de genomas virales que se multiplica exponencialmente. En el panel B se muestra como cada virus auxiliar auto-inactivable es portador de un gen Cre, de modo que la capacidad de expresión de Cre aumenta de modo paralelo al incremento de los genomas virales.

Figura 2. *Esquema de funcionamiento del sistema inducible para la expresión de Cre*. Un promotor constitutivo (PGK) dirige la expresión de la proteína transactivadora rtTA-M2. En presencia del inductor (Doxiciclina), rtTA-M2

dimeriza y activa a un promotor inducible (tetO-pAlb) que controla la expresión de la recombinasa Cre. pA, secuencia de poliadenilación.

Figura 3. *Esquema de funcionamiento de la proteína tTS*. En ausencia de Doxyciclina, tTS se une al promotor inducible e inhibe la expresión de Cre. Cuando se añade Doxyciclina, tTS pierde afinidad por el promotor, deja de inhibir la expresión de Cre, y permite la activación mediada por dímeros de la proteína transactivadora.

Figura 4. *Expresión estable de tTS en células 293*. Se purificó RNA de los distintos clones de células 293 transfectadas con el plásmido que expresa tTS, y se realizó RT-PCR para detectar la producción de mRNA de tTS. Como control se incluyeron los plásmidos que contienen el ADNc. MW, marcador de tamaño.

Figura 5. *Control de la expresión de Cre en los plásmidos inducibles*. Células 293 se transfectaron con los plásmidos indicados: pBS185 expresa Cre bajo el control de un promotor constitutivo CMV; palbCre contiene el promotor inducible controlando la expresión de Cre; pGKrtTA expresa el transactivador bajo el control del promotor PGK; prtTACre contiene los cassettes de expresión de Cre y del transactivador en un mismo plásmido. En A todas las células se mantuvieron en presencia de Doxyciclina. En B, se compararon en presencia o ausencia de Doxyciclina. La expresión de Cre se detectó mediante Western Blot.

Figura 6. *Representación esquemática del virus AdTetCre y su funcionamiento*. La señal de empaquetamiento (ψ) está flanqueada por sitios LoxP en la misma orientación. El transactivador rtTA-M2 está bajo el control del promotor constitutivo del gen PGK murino y la proteína MerCreMer está bajo el control del su promotor inducible TetO-palb. En presencia de Doxyciclina el transactivador rtTA-M2 dimeriza y se une al promotor TetO-palb. Esto activa la expresión de la proteína MerCreMer, que en presencia de Tamoxifen será activa reconociendo los sitios LoxP y eliminando la señal de empaquetamiento para impedir que el virus *helper* se encapside. ITR, Inverted Terminal Repeat.

Figura 7. *Recombinación entre los plásmidos pAdLoxPMerCre y pShutMer para generar el genoma del virus AdTetCre*. En células 293tTS se co-transfectaron los plásmidos pShutMer y pAdLoxPMerCre digeridos ambos con la enzima de restricción Pac I. La recombinación tiene lugar entre las zonas homólogas de ambos plásmidos, restituyéndose el genoma de un adenovirus infeccioso con el cassette de expresión completo para MerCreMer y la señal de empaquetamiento flanqueada por sitios LoxP.

Figura 8. *Control de la expresión de la proteína MerCreMer en el virus AdTetCre*. Células 293tTS se infectaron con el virus AdTetCre a una MOI de 2 virus/célula durante 48 horas, en presencia (líneas 7-9) o ausencia (líneas 4-6) de tratamiento con Tamoxifen y Doxyciclina. En la línea 2 se cargó un extracto de células 293 para verificar detección de la recombinasa nativa con el anticuerpo. En la línea 3 las células 293tTS se transfectaron con el plásmido pANMerCreMer. La línea 1 corresponde a células 293 sin infectar, como control negativo. La expresión de Cre y MerCreMer se detectó mediante inmunotransferencia.

Figura 9. *Regulación de la producción del virus AdTetCre*. Células 293tTS, 293 y 293Cre4 se infectaron con una MOI de 2 virus/célula del virus AdTetCre durante 48 horas, y la producción de virus infeccioso se cuantificó en los extractos celulares. Las células recibieron un tratamiento previo de 24 horas con doxyciclina (Dox), tamoxifeno (Tam), ambos a la vez (T/D), o permanecieron sin tratamiento durante este periodo (Cont), tal y como se indica. Los tratamientos se mantuvieron durante el tiempo de infección.

Figura 10. *Regulación de la producción del virus AdTetCre en comparación con un adenovirus helper estándar*. Células 293tTS, 293 y 293Cre4 se infectaron con una MOI de 2 virus/célula del virus AdTetCre o AdLC8cluc. Las células recibieron un tratamiento previo de 24 horas con doxyciclina y tamoxifeno (T/D) o permanecieron sin tratamiento durante este periodo (Cont), tal y como se indica. Los tratamientos se mantuvieron durante el tiempo de infección. Al cabo de 48 horas la producción de virus infeccioso se cuantificó en los extractos celulares.

Figura 11. *Escisión de la señal de empaquetamiento del virus AdTetCre y AdLC8cluc*. (A) Células 293 se infectaron con una MOI de 2 virus/célula con el virus AdTetCre durante 48 horas. Las células recibieron un tratamiento previo de 24 horas con doxyciclina y tamoxifeno (línea 4) o permanecieron sin tratamiento durante este periodo (línea 3), tal y como se indica. Los tratamientos se mantuvieron durante el tiempo de infección, tras lo cual se extrajo el ADN de las células infectadas y se amplificó por PCR la zona correspondiente al inicio del genoma viral. Como control se muestra el producto de una PCR en la que se utilizó como molde el plásmido pShutMer, que contiene la misma región del genoma (línea 2) o el virus AdTetCre purificado, producido en células 293tTS (línea 1). (B) Células 293Cre4 (línea 2) se infectaron con una MOI de 2 virus/célula con el virus AdLC8cluc y se extrajo el ADN 48 horas después. El análisis por PCR se realizó igual que en el apartado anterior. Como control se utilizó el ADN del virus AdLC8cluc purificado, producido a en células 293 (línea 1). El tamaño correspondiente a un fragmento con señal de empaquetamiento intacta o escindida se indica con una flecha negra o blanca, respectivamente.

Figura 12. *Utilización del virus AdTetCre en la producción de HC-Ad*. (A) Se transfectaron células 293Cre4 con el plásmido que contiene el genoma del HC-Ad KCZ, y 6 horas después se infectaron con una MOI 1 de virus auxiliar AdTetCre. Al cabo de 48 horas se recogieron las células (pase 0). En pases sucesivos se utilizó el lisado del pase anterior para infectar más células 293Cre4 junto con una MOI 1 de virus AdTetCre. Los pases 0-3 se realizan en placas de 60 mm. El pase 4 corresponde a 2 placas de 150 mm, el pase 5 son 8 placas de 150 mm, y el pase 6 es equivalente a 30 placas de 150 mm. En cada pase se cuantificó la cantidad de virus KCZ y AdTetCre mediante inmunocitoquímica.

En todos los casos las células fueron tratadas con doxiciclina y tamoxifeno. (B) El mismo protocolo se siguió en las células 293 hasta el pase 4. (C) El mismo protocolo se siguió en células 293Cre4 utilizando el virus auxiliar AdLC8cluc sin tratamiento con doxiciclina y tamoxifeno.

Figura 13. *Cinética de expresión de la proteína MerCreMer en el virus AdTetCre*. Células 293 se sometieron a un pre-tratamiento de 24 h con tamoxifeno y Doxiciclina, tras lo cual se infectaron con el virus AdTetCre a una MOI de 2 virus/célula. Al cabo de 6, 12, 36 y 48 horas, las células se recogieron y se analizó la expresión de MerCreMer mediante inmunotransferencia. En la línea Control se cargó un extracto de células 293 sin infectar.

10 Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que, sorprendentemente, vectores adenovirales auxiliares en los que la secuencia de empaquetamiento se encuentra flanqueada por sitios diana de reconocimiento de una recombinasa y que comprenden, adicionalmente, una secuencia que codifica una recombinasa, en donde dicha secuencia se encuentra operativamente asociada a un promotor inducible permiten la generación de adenovirus *gutless* con un bajo grado de contaminación con los virus auxiliares. Sin querer estar vinculado por ninguna teoría, se piensa que la inclusión de la secuencia codificante en el propio adenovirus auxiliar permite que la expresión de la recombinasa aumente de forma paralela al aumento de copias del propio virus, de forma que siempre existe una cantidad suficiente de recombinasa para escindir la secuencia de empaquetamiento de todas las copias del genoma del adenovirus auxiliar y sea insensible a la inhibición de la expresión de las proteínas celulares provocado por el propio virus. La figura 1 muestra esquemas comparativos de los métodos convencionales de empaquetamiento de adenovirus en los que la recombinasa es expresada por la célula en la que se lleva a cabo dicho empaquetamiento (panel izquierdo) o según el método de la invención en el que la recombinasa se expresa por el genoma del propio virus auxiliar (panel derecho). De forma ilustrativa, la parte experimental describe (véase ejemplo 3) que los adenovirus que comprenden las características de la invención expresan recombinasa de forma dependiente de la presencia de doxiciclina en el medio.

Polinucleótido de la invención

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un polinucleótido que comprende:

- (i) una región que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde dicha región se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible y
- (ii) una región esencial para la replicación y/o para el empaquetamiento del genoma adenoviral flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas para la recombinasa codificada por la secuencia a) en donde dichas secuencias de reconocimiento se encuentran orientadas de forma que se produzca la escisión de dicha región esencial en presencia de dicha recombinasa.

Por recombinasa específica de sitio se entiende, según la presente invención, una proteína que es capaz de promover la recombinación específica de sitio entre sitios diana para dicha recombinasa. Recombinasas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen la recombinasa Cre del fago P1 (LoxP), la recombinasa FLP de *S. cerevisiae* (Frt), la integrasa del fago de *Streptomyces* ΦC31 (attB, attP), la recombinasa TP901-1, la recombinasa R4, o la integrasa lambda. En una forma preferida de realización, la recombinasa codificada por el polinucleótido de la invención es la recombinasa Cre que incluye tanto la recombinasa Cre del fago P1 tal y como fue descrita originalmente por Abreinski y Hoess (J. Biol. Chem. 1984, 259:1509- 1514), así como proteínas de fusión que comprenden la secuencia de la recombinasa y un segundo polipéptido que regula la actividad de la recombinasa. La recombinasa Cre, tanto si se utiliza tal cual como si se usa en forma de proteína de fusión, puede estar modificada para que tenga una especificidad más amplia con respecto a las secuencias diana tal y como ha sido descrito en WO2000060091.

En el caso de que el polinucleótido de la invención comprenda una secuencia que codifica una proteína de fusión que comprende una recombinasa, es posible el uso de polipéptidos que actúan como secuencias de localización nuclear activables, es decir, que únicamente actúan como tales en presencia de un ligando determinado. De esta forma, es posible regular a voluntad la actividad de la recombinasa de forma que únicamente en presencia de dicho ligando se transloca al núcleo y ejerza su actividad. En una forma preferida de realización, la secuencia de localización nuclear activable procede de un receptor nuclear. Secuencias de localización nuclear adecuadas para el uso en la presente invención incluyen la secuencia de localización derivada de PPAR (receptores activados por activadote peroxisomales), que se translocan al núcleo en presencia de 15-desoxy-[Delta]-prostaglandina J2, receptores del ácido retinoico que se translocan al núcleo en presencia de los isómeros alfa, beta o gamma del ácido 9-cis-retinoico, receptores de farneoside X, activables por ácido retinoico y TTNPB, receptores X hepáticos activables por 24-hidroxicolesterol, receptores de benzoato X, activables por 4-aminobutil benzoato, receptor constitutivo de androstano, receptores de pregnano, inducibles por pregnolono-16 carbonitrilo y receptores de esteroides y xenobióticos, inducibles por rifampicina, receptores de progesterona, inducibles por medroxiprogesterone así como por agonistas y antagonistas de mifepristona y derivados de 19-nortestorena, receptores de glucocorticoides activables por glucocorticoides, receptores de hormonas tiroideas, activables por T3 y/o T4 y receptores de estrógenos, activables por estrógenos y sus derivados tales como el 17-betaestradiol y el estradiol. Alternativamente, es posible utilizar una proteína de fusión que se encuentra inactiva mediante su unión a otra proteína y que, en presencia de ligando, se disocia de dicha proteína adicional, resultando así en la activación inducible de la proteína de fusión.

Preferiblemente, la secuencia de localización nuclear activable corresponde al dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos, según ha sido descrito en WO0228175. Por "dominio de unión a ligando" se entiende, en el contexto de la presente invención, la secuencia del dominio de unión a estrógenos del receptor de estrógenos y preferiblemente las variantes del mismo que comprenden una o mas mutaciones resultante de la inserción, delección y/o sustitución de uno o más amino ácidos pero que mantienen sustancialmente intacta la capacidad de translocarse al núcleo en presencia de un ligando determinado, aunque los ligandos preferidos de las variantes pueden variar con respecto a los del receptor nativo. Así, la presente invención contempla el uso de secuencias de localización nuclear que responden preferentemente a ligandos naturales del receptor de estrógenos (estradiol, estriol o estrona) o a diferentes agonistas y antagonistas del mismo tales como tamoxifeno, ICI 164384, RU 54876, dietilestilbestrol, raloxifeno, zuclomifeno y toremifeno.

La recombinasa y la secuencia de localización nuclear pueden encontrarse en cualquier localización relativa con respecto al otro elemento de la proteína de fusión. Así, la invención contempla polinucleótidos que codifican proteínas de fusión en los que la región C terminal de la recombinasa, polinucleótidos que codifican proteínas de fusión en los que la región C terminal de la recombinasa se encuentra conectada con la región N-terminal de la secuencia de localización nuclear y preferentemente polinucleótidos que codifican proteínas de fusión formadas por una recombinasa flanqueada por dos secuencias de localización nuclear que pueden ser idénticas o distintas, aunque preferiblemente son idénticas. Adicionalmente, la invención contempla el uso de variantes de la secuencia de localización nuclear que muestran una afinidad por los ligandos distinta a la que muestra la secuencia de localización nuclear del receptor nativo. Así, la invención contempla el uso de la secuencia del dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno que comprende la mutación G512R (numerada según el receptor de estrógenos humano). Esta mutación resulta en una afinidad del dominio de unión a ligando hacia el ligando natural 1000 veces menor que la que muestra el dominio de unión a ligando del receptor nativo, pero que sin embargo no afecta su afinidad por el 4-hidroxitamoxifeno. De esta forma es posible promover la translocación de la fusión con la proteína con actividad recombinasa usando 4-hidroxitamoxifeno sin afectar la posible respuesta de la célula empaquetadora a los estrógenos. Alternativamente, el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos puede contener las mutaciones G400V/M543A/L544A, que resultan en un dominio de unión a ligando 10 veces más sensible cuya translocación nuclear puede ser activada usando una dosis 4 veces menor que la necesaria para activar la translocación nuclear del mutante G512R. Alternativamente, el dominio de unión a ligando puede comprender las mutaciones M543 and L544A que dan lugar a una molécula que muestra una sensibilidad a tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno 10 veces mayor que la mostrada por el mutante G400V/M543A/L544A. En una forma preferida de realización, la secuencia de localización nuclear activable es el dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno humano (Metger *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92:6991-6995) o la variante G521R del mismo, según ha sido descrito por Feil *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93:10887-10890). En otra forma preferida de realización, la recombinasa comprende la variante G525R de la secuencia de localización nuclear activable por estrógenos derivada del receptor de estrógenos murino (amino ácidos 281-599 de dicho receptor) en cada extremo de la proteína, como por ejemplo, la proteína MerCreMer según ha sido descrita en detalle por Verrou *et al.* (Biol. Chem., 1999, 380:1435-1438) y Tannour-Louet M. *et al.* (Hepatology, 2002; 35; 1072-1081), cuyos contenidos se incluyen por referencia.

El polinucleótido de la invención comprende una secuencia que codifica una recombinasa y que se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible. Por promotor inducible se entiende, en el contexto de la presente invención, toda secuencia de ADN que es capaz de promover la transcripción de un polinucleótido localizado en dirección 3' en presencia de un compuesto o condición determinada. Preferiblemente, los promotores inducibles que pueden ser usados en el contexto de la presente invención son aquellos que responden a un agente inductor, que muestran una expresión basal nula o despreciable en ausencia de agente inductor y que son capaces de promover la activación del gen localizado en posición 3'. En función del tipo de agente inductor, los promotores inducibles se clasifican en promotores Tet on/off (Gossen, M. y H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. *et al.*, 1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. y H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); promotores Pip on/off (US6287813); promotores dependientes de antiprogesterina (US2004132086), promotores dependientes de ecdisona (Christopherson *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6314-6318; No *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351, Suhr *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004 y WO9738117), un promotor dependiente de metalotioneina (WO8604920) y promotores dependientes de rapamicina (Rivera *et al.*, 1996, Nat. Med. 2:1028-32).

En una forma preferida de realización, el promotor inducible es un sistema dependiente de tetraciclina. Este sistema permite obtener altos niveles de expresión de forma regulada por tetraciclina o derivados de la misma como la doxiciclina. En este sistema, la expresión del gen se activa en presencia de doxiciclina y se inactiva en ausencia de doxiciclina. Este sistema se basa en dos elementos reguladores que aparecen en el operón de resistencia a tetraciclina de *E. coli*, en concreto, la secuencia operadora de tetraciclina, a la que se une el represor de tetraciclina. El gen de interés se clona en dirección 3' con respecto a un promotor que comprende varios elementos de respuesta a tetraciclina. Un segundo plásmido contiene la secuencia que codifica un elemento regulador que se denomina el transactivador controlado por tetraciclina, que se compone del factor transcripcional VP16 del virus del herpes simplex y del represor de tetraciclina nativo (rtTA-M2, descrito por Zabala *et al.*, Cáncer Res., 64:2799-2804). Así, en presencia de doxiciclina, la proteína de fusión formada por el represor de tetraciclina y VP16 interacciona con el promotor inducible promoviendo la transcripción del gen localizado en dirección 3' con respecto al promotor. Dicho promotor inducible está formado, preferiblemente, por varias copias del operador Tet (TetO) fusionado a un promotor mínimo como, por ejemplo, el promotor mínimo del CMV, el promotor de 29 pares de bases de la proteína central del virus de la hepatitis B humano o los promotores de la región 5' del gen de albúmina ratón de 196 o de 84 pares de bases o del promotor de albúmina (Zabala *et al.*, 2004, *supra*).

El experto en la materia apreciará que el transactivador de respuesta a tetraciclina puede estar codificado por el genoma de la célula usada para el empaquetamiento, por el propio polinucleótido que comprende la secuencia que codifica la recombinasa bajo el control del promotor sensible a tetraciclina o, en una forma de realización preferida, por ambos. De esta forma, la cantidad de transactivador producido dependerá del número de copias del genoma adenoviral en la célula, lo que a su vez permitirá adaptar la cantidad de transactivador a la cantidad de promotores presentes en las células. La secuencia que codifica el transactivador se encuentra regulada por un promotor constitutivo. Promotores constitutivos adecuados para la regulación del transactivador dependiente de ligando son, entre otros, el promotor CMV, el promotor SV40, el promotor DHFR, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor del factor de elongación 1a (EF1a), el promotor de albúmina, el promotor de ApoA1, el el promotor de queratina, el promotor de CD3, el promotor de las cadenas pesada o ligera de la inmunoglobulina, el promotor de neurofilamento, el promotor de la enolasa específica de neuronas, el promotor L7, el promotor CD2, el promotor de la quinasa de la cadena ligera de miosina, el promotor del gen HOX, el promotor de la timidina quinasa, el promotor de la RNA Polimerasa II, el promotor del gen MyoD, el promotor del gen de la fosfogliceroquinasa (PGK), el promotor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), el promotor del gen de actina. En una forma preferida de realización, el promotor que regula la expresión del transactivador es el promotor del gen de PGK.

El polinucleótido de la invención comprende también una región esencial para la replicación y/o para el empaquetamiento del adenovirus que se encuentra flanqueada por sitios diana para la recombinasa que se encuentra codificada por dicho polinucleótido. Regiones del genoma adenoviral esenciales para la replicación y/o para el empaquetamiento de dicho genoma incluyen las repeticiones terminales invertidas (ITR) y la secuencia de empaquetamiento adenoviral ψ .

Por repetición terminal invertida o ITR se entiende, según la presente invención, secuencias de aproximadamente 100 pares de bases que se encuentran a ambos lados del genoma lineal de los adenovirus y que son esenciales para la replicación del genoma adenoviral (Stow, N.D., 1982, Nucl. Acid. Res, 10:5105-5109).

Por señal de empaquetamiento adenoviral ψ se entiende, según la presente invención una secuencia de aproximadamente 160 pares de bases de longitud que, en el caso de los adenovirus de los serotipos 2 y 5, se extiende entre las posiciones 190 y 350 del genoma. La eliminación de la secuencia del genoma de un adenovirus impide que las moléculas de ADN que se generan durante la multiplicación del virus se incorporen de forma eficiente a las cápsidas recién formadas (Hearing, P. *et al.*, 1987, J.Virol., 61:2555-2558), pero no impiden la replicación de dicho genoma en la célula empaquetadora, a diferencia de la eliminación de los ITRs.

En una forma preferida de realización, la región del genoma adenoviral que forma parte del polinucleótido de la invención es la señal de empaquetamiento adenoviral. Evidentemente, la elección de los sitios diana correspondientes flanqueando la señal de empaquetamiento adenoviral deberá hacerse en base a la recombinasa que está codificada por el polinucleótido de la invención. Así, si la recombinasa codificada por el polinucleótido es la recombinasa Cre, la secuencia de empaquetamiento deberá estar flanqueada por sitios loxP. Si la recombinasa codificada por el polinucleótido es la recombinasa FLP, la secuencia de empaquetamiento deberá estar flanqueada por sitios FRT. En una forma de realización preferida, la recombinasa codificada por el polinucleótido de la invención es la recombinasa Cre y los sitios diana de dicha recombinasa (sitios LoxP) se encuentran flanqueando la secuencia de empaquetamiento ψ en la misma dirección de modo que se produce una escisión de la secuencia comprendida entre ellos.

Los sitios LoxP están formados por una secuencia de 34 pares de bases que están formados, a su vez, por dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases que flanquean una región central de 8 pares de bases. La invención contempla así mismo el uso de variantes de la secuencia LoxP nativa que son incapaces de sufrir recombinación con las secuencias LoxP sino que únicamente pueden recombinar con idénticas variantes LoxP, tales como las descritas en WO199925851 y WO2007085906. Estas secuencias LoxP variantes son particularmente útiles cuando la célula que va a ser usada para el empaquetamiento de los adenovirus comprende regiones en su genoma flanqueadas por secuencias LoxP nativas. Secuencias LoxP variantes de utilidad en el contexto de la presente invención incluyen las secuencias loxP, loxP2, loxP511, loxP514, loxB, loxC2, loxL, loxR, loxA86, loxA117, loxP3 y loxP23.

Vectores adenovirales auxiliares de la invención

Los polinucleótidos de la invención descritos anteriormente pueden formar parte o pueden ser de utilidad para la construcción de un vector de expresión que incluye secuencias necesarias para su función como vector adenoviral. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la invención. En una forma preferida de realización, el vector que comprende el polinucleótido de la invención es un vector adenoviral auxiliar.

Por "vector auxiliar" se entiende, en el contexto de la presente invención, un vector capaz de trans-complementar parcial o totalmente un vector viral recombinante que es incapaz de replicarse. Es por tanto, un vector capaz de producir al menos un polipéptido, temprano o tardío, que el vector recombinante es incapaz de producir y que es necesario para la formación de la partícula viral. Los vectores auxiliares pueden complementar el vector adenoviral totalmente, es decir, que el vector auxiliar es capaz de aportar todos aquellos componentes del adenovirus necesarios para la replicación de los que carece el vector adenoviral o puede complementar al vector adenoviral sólo en parte, es decir, que es capaz de complementar únicamente parte de las funciones de las que carece el vector adenoviral.

El experto en la materia apreciará que la secuencia del vector adenoviral auxiliar dependerá del vector adenoviral que se utilice dado que, dependiendo del número de secuencias codificantes del genoma adenoviral que se encuentren ausentes en el vector adenoviral, el vector auxiliar deberá incluir un mayor o menor número de secuencias para permitir la replicación y empaquetamiento de dicho vector adenoviral. En el caso de que el vector adenoviral sea un vector *gutless* (también conocido como vector adenoviral de alta capacidad o vector dependiente de auxiliar), el vector auxiliar de la invención debe incluir prácticamente todas las regiones adenovirales de transcripción temprana y tardía, con excepción de la región temprana E3, que es dispensable para la replicación viral *in vitro* y, preferentemente también la región E1, que puede ser aportada por la célula empaquetadora. En una forma preferida de realización, el vector auxiliar de la invención comprende el genoma de un vector adenoviral de primera generación, caracterizada porque carece de las secuencias codificantes para las proteínas E1 y E3 y en donde el gen que codifica la recombinasa se inserta en lugar de la región codificante para la proteína E1. De esta forma, el vector adenoviral auxiliar de la invención comprende los siguientes elementos:

- La repetición terminal invertida 5',
- La secuencia de empaquetamiento ψ flanqueada por sitios diana de reconocimiento de una recombinasa,
- La secuencia de la recombinasa, bajo el control de un promotor inducible,
- Las secuencias codificantes de adenovirus, excepto las regiones E1 y E3.
- La repetición terminal invertida 3'.

En una forma preferida de realización, el genoma del adenovirus auxiliar codifica un transactivador que es capaz de promover la expresión de la recombinasa en presencia de un ligando. En una forma de realización aún más preferida, el transactivador es el transactivador rtTA-M2, formado por el represor de tetraciclina unido a la proteína VP16 del virus del herpes simplex, en cuyo caso la etapa (iii) del método se lleva a cabo en presencia de un análogo de tetraciclina, preferiblemente doxiciclina.

La figura 2 proporciona una representación esquemática del vector adenoviral de la invención incluyendo la secuencia que codifica el transactivador transcripcional bajo el control del promotor del gen PGK y en donde la recombinasa se encuentra bajo el control de un promotor formado por varias repeticiones del operador tet asociado al promotor mínimo del gen de albúmina.

Preferiblemente, la secuencia de empaquetamiento Ψ se encuentra flanqueada por sitios loxP. En una forma de realización aún más preferida, la recombinasa es la recombinasa Cre o la recombinasa MerCreMer que se puede encontrar bajo el control de un promotor formado por una serie de repeticiones del operador TetO y por un promotor mínimo como, por ejemplo, el promotor de albúmina. Adicionalmente, es posible usar secuencias de empaquetamiento atenuadas también flanqueadas por sitios diana de recombinasas. Estas señales muestran una capacidad reducida de ser encapsuladas y pueden ser obtenidas, por ejemplo, mediante la delección de la región de empaquetamiento tal y como ha sido descrito en WO9428152.

Adicionalmente, es posible aumentar la seguridad del vector auxiliar mediante el uso de una pareja de sitios diana de reconocimiento de recombinasas adicionales flanqueando otra región esencial del genoma del dicho adenovirus, como por ejemplo, las regiones ITR, de forma que la presencia de la recombinasa provoque la eliminación de más de una región del genoma del adenovirus indispensable para su replicación o encapsulación.

El experto en la materia apreciará que el vector auxiliar puede ser un virus replicativo, es decir, que presenta todos los genes necesarios para su replicación y empaquetamiento o puede ser un adenovirus defectivo en uno o varios genes, con el fin de evitar la posible propagación del vector adenoviral en el entorno. Dado que estas proteínas son esenciales para la propagación del adenovirus, éstas deben ser aportadas *in trans*, preferiblemente por las células usadas para el empaquetamiento. Líneas celulares adecuadas para este propósito son la línea celular 293 (Graham *et al.*, 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72), derivada de células de riñón embrionario humano y capaz de complementar la función E1 puesto que contienen el extremo 5' terminal del adenovirus de tipo 5 integrado en su genoma, la línea celular W162 que es capaz de complementar las funciones E1 y/o E4 del adenovirus (Weinberg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:5383-5386), las líneas celulares capaces de complementar el genoma completo del adenovirus de tipo 5 o de las funciones E1 y E4 (WO9428152), la línea N52, la línea Perc y similares.

El vector adenoviral auxiliar de la invención puede encontrarse como un polinucleótido que comprende todas las funciones descritas anteriormente o, alternativamente, si el polinucleótido ha sido generado y/o amplificado mediante su transfección en células permisivas, este dará lugar a la generación de partículas adenovirales completas que pueden ser recuperadas de las células empaquetadoras y utilizadas como vectores auxiliares en lugar del polinucleótido. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una partícula adenoviral que comprende la secuencia de un polinucleótido de la invención. Por partícula adenoviral se entiende, en el contexto de la presente invención, una partícula formada por una molécula de ADN de doble cadena que forma el genoma adenoviral tal y como han sido descrito, por ejemplo, por Shenk, T. (Adenoviridae: The viruses and their replication., 1996, In Fields Virology. B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds. (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA) pp. 2111-2147).

Sistemas y métodos de propagación de los adenovirus auxiliares de la invención

Los vectores auxiliares de la invención pueden ser amplificados mediante sucesivos ciclos de replicación en células eucariotas permisivas. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema para la replicación y empaquetamiento de un adenovirus recombinante, que comprende:

- a) un polinucleótido de la invención, un vector de expresión de la invención o una partícula adenoviral de la invención y
- b) una célula eucariota.

El experto en la materia apreciará que la replicación del adenovirus en la célula eucariota requiere que no se produzca expresión de la recombinasa codificada por el polinucleótido de la invención, puesto que si se expresase la recombinasa, esta provocaría la escisión de región del genoma adenoviral que se encuentra flanqueada por sitios diana de dicha recombinasa, lo que impediría la propagación de nuevos virus auxiliares. En el caso de que la secuencia que codifica la recombinasa se encuentra bajo el control del operador de tetraciclina, este tiene un nivel bajo de expresión basal. Sin embargo, esta expresión basal puede reducirse aún más si las células en las que se lleva a cabo la propagación del adenovirus auxiliar expresan un represor dependiente de tetraciclina que es capaz de impedir la transcripción de los genes posicionados en dirección 3' con respecto a los operadores de tetraciclina en ausencia de doxiciclina. Así, en una forma preferida de realización, la célula que forma el componente (b) del sistema para la replicación de adenovirus de acuerdo a la invención comprende un represor transcripcional específico para el promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio. En una forma preferida de realización, si el promotor que regula la expresión de la recombinasa es un promotor activable por tetraciclina o un análogo de la misma (doxiciclina), el represor que expresa la célula empaquetadora es un represor que se activa en ausencia de dicho ligando. Así, en una forma preferida de realización, las células empaquetadoras de la invención contienen un polinucleótido que expresa el represor dependiente de tetraciclina que en ausencia de esta o doxiciclina se une a los operadores Tet bloqueando la transcripción. Preferiblemente, el represor específico del operador tet es el represor rtTS. En una forma de realización aún más preferida, el represor rtTS se encuentra bajo el control operativo de un promotor constitutivo. Preferiblemente, el promotor que regula la expresión de rtTS es el promotor del factor de elongación eucariota EF1a.

La figura 3 indica en el panel izquierdo el mecanismo que permite la represión de la expresión del gen que codifica la recombinasa en ausencia de doxiciclina.

Adicionalmente, en el caso de que la recombinasa comprenda una secuencia de localización nuclear activable, la propagación del adenovirus auxiliar debe hacerse en ausencia del ligando capaz de activar dicha secuencia de localización nuclear, de forma que, aún existiendo una cantidad mínima de recombinasa debida a la transcripción basal de dicho gen, ésta permanezca en el citoplasma y sea incapaz de ejercer su actividad recombinasa sobre el genoma adenoviral.

Los vectores auxiliares de la invención y los sistemas de empaquetamiento de los mismos se pueden utilizar para amplificar dichos vectores. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante primer método de la invención) para la obtención de un adenovirus auxiliar recombinante que comprende

- (i) contactar una célula con un polinucleótido de la invención, con un vector de expresión según la invención o con una partícula adenoviral según la invención y, opcionalmente, con uno o varios polinucleótidos que codifican las proteínas adenovirales necesarias para el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula del genoma adenoviral o del polinucleótido que comprende dicho genoma,
- (ii) mantener la célula en condiciones adecuadas para permitir el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula y para impedir la expresión de la recombinasa específica de sitio y
- (iii) recuperar los adenovirus del medio.

La etapa (i) del primer método de la invención comprende la introducción en la célula del genoma de dicho adenovirus. El experto en la materia apreciará que la etapa (i) se lleva a cabo de distinta manera dependiendo de la forma en que se encuentre dicho genoma adenoviral. En caso de que dicho genoma se encuentre como un polinucleótido, la etapa (i) comprende la puesta en contacto de dicho polinucleótido con la célula en condiciones que permiten su entrada en la célula. La transfección se puede llevar a cabo mediante microinyección de una composición que comprende el polinucleótido o, alternativamente, mediante co-precipitación en presencia de fosfato calcio o cloruro cálcico, mediante transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, electroporación así como toda una serie de kits de transfección basados en las técnicas anteriores y que se encuentran comercialmente disponibles. La eficacia de la transfección dependerá de una serie de factores que incluyen el tipo de célula, el número de pases, el estado de confluencia así como las condiciones (tiempo, forma de preparación de los liposomas o de los precipitados, etc.) de la transfección. Todos estos parámetros pueden ser determinados y ajustados mediante experimentación rutinaria.

En el caso de que el vector adenoviral sea una partícula adenoviral de acuerdo a la invención, es suficiente con poner en contacto el adenovirus con la célula de forma que el adenovirus infecte la célula de forma natural. Preferiblemente, el virus se pone en contacto con las células usando una relación de número de partículas virales a células (multiplicidad de infección o MOI) de al menos aproximadamente 1,2, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 2000 o cualquier otro valor de MOI adecuado para que se infecten sustancialmente todas las células del cultivo.

En el caso de que el vector adenoviral auxiliar carezca de alguna de las secuencias que codifican componentes esenciales para su replicación y/o empaquetamiento, es necesario aportar dichos componentes en *trans*. Preferiblemente, los componentes son aportados a partir de la expresión de polinucleótidos que forman parte del genoma de las células que se usan como empaquetadoras. Así, en el caso de los vectores adenovirales cuyos genomas carecen de las regiones E1 y/o E4, las células que se utilizan en el paso (i) del método de la invención son, entre otras, células pertenecientes a las líneas celulares 293 (Graham *et al.*, 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72), W162 (Weinberg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:5383-5386) y las líneas celulares descritas en WO9428152 según se describió anteriormente.

En la etapa (ii), el primer método de la invención contempla mantener las células que han incorporado el genoma adenoviral en la etapa (i) en condiciones adecuadas para permitir el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula y para impedir la expresión de la recombinasa específica de sitio. Dado que la recombinasa se encuentra bajo el control operativo de un promotor inducible, en condiciones ideales dicho promotor no debería activar la transcripción al menos que se encontrase en presencia del agente activador. Sin embargo, todos los promotores inducibles tienen cierta actividad basal que, en el caso de los vectores auxiliares que nos ocupan, daría lugar a la eliminación de la secuencia esencial (preferiblemente la secuencia de empaquetamiento Ψ) dando así lugar a genomas adenovirales incapaces de encapsidarse y, por tanto, disminuyendo el rendimiento del procedimiento. Por tanto, en una forma preferida de realización, el proceso de encapsidación se lleva a cabo en células que expresan un represor transcripcional que se une al sitio de unión del promotor que regula la expresión de la recombinasa bloqueando la transcripción a partir de éste. Preferiblemente, dicho represor transcripcional es activo en ausencia del ligando que activa dicho promotor transcripcional. En el caso particular de un promotor activado por el activador dependiente de tetraciclina rTA, el represor transcripcional se une de forma específica a los operadores de tetraciclina en ausencia de doxiciclina bloqueando por tanto la expresión del gen de la recombinasa.

La etapa (ii) se lleva a cabo durante el tiempo necesario para que la concentración de partículas virales sea lo suficientemente alta, según se determina mediante medios estándar tales como el método Resource Q basado en HPLC, según ha sido descrito por Shabram *et al.*, (Hum. Gene Ther. 1997, 8:453-465), o de modo indirecto mediante inspección visual del efecto citopático en las células. Opcionalmente, el cultivo de las células puede incluir la adición de medio de cultivo fresco.

En una tercera etapa, los adenovirus generados durante la etapa (ii) son recuperados del cultivo celular. Para ello será necesario separar las células del medio de cultivo por cualquier método conocido por los expertos en la técnica (tripsinización o arrastre mecánico, y centrifugación o filtración), romper las células en solución inerte (ciclos de congelación/descongelación, homogeneización, sonicación, cavitación, uso de detergentes y similares) y purificar las partículas de adenovirus por métodos conocidos como pueden ser la ultracentrifugación en gradiente de CsCl o mediante distintos tipos de cromatografía tales como una combinación de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad con quelatos metálicos (Huyghe *et al.*, 1996, Human Gene Therapy, 6:1403-1416), una combinación de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fraccionamiento en gel (WO07059473), cromatografía en dietilaminoetil (DEAE) celulosa (Haruna *et al.*, 1961, Virology 13, 264-267), cromatografía en hidroxipatito (US2002/0064860) y cromatografía en otras resinas tales como geles blandos (agarosa), polímeros macroporosos basados en polímeros sintéticos que incluyen cromatografía de permisión (fractogel) y materiales basados en un gel blando en una cápsula dura (por ejemplo, Ceramica HyperD® F) (Rodrigues, 1997, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl 699:47-61).

En otro aspecto, la invención contempla los adenovirus auxiliares obtenidos según el primer método de la invención.

Sistemas y métodos de propagación de adenovirus que comprenden un gen de interés usando los adenovirus auxiliares de la invención

Los adenovirus auxiliares objeto de la invención pueden utilizarse en sistemas y procedimientos para la replicación y empaquetamiento de adenovirus de alta capacidad que comprenden un gen de interés. Así, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso de un polinucleótido de la invención o de un vector de la invención o de una partícula adenoviral según la invención para la producción y empaquetamiento de adenovirus de alta capacidad.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema para la producción de un adenovirus recombinante de alta capacidad que comprende

- (a) un polinucleótido de la invención, un vector de expresión según la invención o una partícula adenoviral según la invención;
- (b) un adenovirus cuyo genoma comprende un gen de interés y que carece de la secuencia que codifica al menos una de las proteínas esenciales para la replicación o al menos una de las proteínas esenciales para

el empaquetamiento de dicho adenovirus o con un polinucleótido que comprende el genoma de dicho adenovirus y

(c) una célula eucariota.

5

En dicho sistema, el primer componente es esencialmente el descrito en los sistemas de amplificación de adenovirus auxiliares y consiste en un polinucleótido que comprende al menos parte del genoma del adenovirus auxiliar que aporta, bien en su totalidad o bien parcialmente, los componentes necesarios para la replicación y empaquetamiento de los adenovirus de alta capacidad.

10

El segundo componente comprende adenovirus de alta capacidad o polinucleótidos que comprenden el genoma de dichos virus en donde dicho genoma carece de la secuencia que codifica al menos una de las proteínas esenciales para la replicación o al menos una de las proteínas esenciales para el empaquetamiento de dicho adenovirus y que va a ser amplificado usando el sistema de la invención. Por “adenovirus de alta capacidad” se entiende, según la invención, adenovirus recombinantes de los denominados dependientes de auxiliar o *gutless* caracterizados porque se ha eliminado todos los genes del genoma adenoviral excepto las regiones ITR 5' y 3' y la región de empaquetamiento ψ , tal y como se ha descrito, por ejemplo, por Alba *et al* (Gene Therapy, 2005, 12:S18-S27). Estos adenovirus admiten secuencias heterólogas de hasta 36 kDa puesto que carecen de secuencias propias del genoma adenoviral.

20

Genes heterólogos que pueden incorporarse en los vectores *gutless* de acuerdo con los métodos de la invención incluyen los genes que codifican eritropoietina (EPO), leptinas, hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), hormona liberadora de hormona somatotropa (GHRH), hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de prolactina (PRH), hormona liberadora de melatonina (MRH), hormona inhibidora de prolactina (PIH), somatostatina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona somatotropa o del crecimiento (GH), hormona luteinizante (LH), hormona foliculoestimulante (FSH), tirotropina (TSH u hormona estimulante del tiroides), prolactina, oxitocina, hormona antidiurética (ADH o vasopresina), melatonina, factor inhibidor Mülleriano, calcitonina, hormona paratifoidea, gastrina, colecistoquinina (CCK), secretina, factor de crecimiento de tipo insulina tipo I (IGF-I), factor de crecimiento de tipo insulina tipo II (IGF-II), péptido natriurético atrial (PNA), gonadotrofina coriónica humana (GCH), insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático (PP), leptina, neuropéptido Y, renina, angiotensina I, angiotensina II, factor VIII, factor IX, factor tisular, factor VII, factor X, trombina, factor V, factor XI, factor XIII, interleukina 1 (IL-1), interleukina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral Alfa (TNF- α), interleukina 6 (IL-6), Interleukina 8 (IL-8 y chemoquinas), interleukina 12 (IL-12), interleukina 16 (IL-16), interleukina 15 (IL-15), interleukina 24 (IL-24), interferones alpha, beta, gamma, CD3, ICAM-1, LFA-1, LFA-3, quimioquinas incluyendo RANTES 1 α , MIP-1 α , MIP-1 β , factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), proteínas morfogenéticas del Hueso (BMPs), factores de crecimiento de los fibroblastos (FGF y KGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF y relacionados), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento glial, factor de crecimiento de queratinocitos, factor de crecimiento endotelial, antitripsina 1 alfa, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos (GM-CSF), cardiotrofina 1 (CT-1), oncostatina M (OSM), anfiregulina (AR), ciclosporina, fibrinógeno, lactoferrina, activador de plasminógeno tipo tisular (tPA), quimotripsina, inmunoglobinas, hirudina, superóxido dismutasa, imiglucerasa, β -glucocerebrosidasa, α -L-glucosidasa- α , α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, galsulfasa, α -galactosidasa A humana, inhibidor de la proteinasa α -1, lactasa, enzimas pancreáticas (lipasa, amilasa, proteasa), adenosina deaminasa, inmunoglobulinas, albúmina, toxinas botulínicas de tipo A y B, collagenasa, deoxirribonucleasa I humana, hialuronidasa, papaina, L-asparaginasa, lepirudin, estreptoquinasa, péptidos inhibidores del factor de transformación celular beta (TGF- β) tales como los descritos en WO0331155, WO200519244 y WO0393293, cuyo contenido se incorpora en la presente invención por referencia, casetes de expresión apropiados para la transcripción de moléculas de RNA de interferencia (shRNA, siRNA, miRNA, RNA de ribonucleoproteínas U1 modificadas).

50

Además de dichos genes heterólogos, los adenovirus *gutless* utilizados en la invención pueden contener regiones de relleno o *stuffer* tales como la secuencias de relleno derivadas del genoma del fago lambda descritas por Parks *et al.* (J. Virol., 1999, 73:8027-8034) o el ADN de relleno que aparece en pSTK120 según ha sido descrito por Sandig *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:1002-7). Estas regiones contienen habitualmente secuencias presentes en el genoma humano y capaces de aumentar la expresión de los genes heterólogos con respecto a los adenovirus controles que en lugar de dicho DNA de relleno humano comprenden el fragmento de 22 kb del fago lambda descrito en Parks *et al.* (J. Virol., 1999, 73:8027-8034).

55

La longitud total del ADN de relleno humano puede variar pero oscila entre 20 a 30 kb, preferiblemente de 20 a 25 kb o, aún más preferiblemente, de 21 a 23 kb, por ejemplo, 22 kb. El número de secuencias que actúan en cis en dicho ADN de relleno puede variar entre 2, 3 o 4 o más e incluye, sin limitación, el dominio repetido alfoide de 16.2 kb (descrito en Smith J G *et al.*, 1995, Mol. Cell. Biol., 15:5165-72); regiones de adhesión a la matriz (MAR) como por ejemplo el fragmento de 4.2 kb que contiene el extremo izquierdo del adenovirus de tipo 6 o dos copias de la región de adhesión a la matriz de la inmunoglobulina κ (según fue descrito por Betz A G *et al.*, 1994, Cell, 77:239-248); una región de control de hepatocitos (HCR) tales como el fragmento de 1.2 kb que comprende dicho HCR (según fue descrito por Miao *et al.*, Molecular Therapy, 1:522-32); u otra región de adhesión a matriz tales como el la región de 2.8 kb de la lisozima de pollo (según ha sido descrito por Phi-Van L *et al.*, 1990, Mol. Cell. Biol. 10:2302-2307, región

65

de adhesión a matriz de la región 5' del interferón β (según ha sido descrito por Bode J *et al.* 1992, Science, 10:195-197) u otras secuencias humanas no codificantes tales como secuencias teloméricas o centroméricas.

Por último, el sistema para la producción de un adenovirus recombinante de alta capacidad de acuerdo a la invención comprende, adicionalmente, una célula eucariota en la que se efectúa el proceso de amplificación de dichos adenovirus. Células eucariotas adecuadas para su uso en dicho sistema incluyen todas aquellas líneas celulares que puedan ser infectadas por el adenovirus de forma espontánea (si los adenovirus que forman los componentes (a) y (b) del sistema) o líneas celulares susceptibles de ser transfectadas con polinucleótidos que comprenden los genomas de los adenovirus auxiliares y de alta capacidad. Adicionalmente, si el genoma del adenovirus auxiliar no comprende la secuencia que codifica el transactivador capaz de activar la expresión de la recombinasa, las células que forman el componente (c) deben de expresar dicho transactivador, preferiblemente de forma estable y preferiblemente bajo el control de un promotor constitutivo. Esto puede ser beneficioso para acelerar la cinética de expresión de la recombinasa comprendida en el adenovirus auxiliar, y facilitar de esta manera la escisión de su secuencia de empaquetamiento. En una forma preferida de realización, es posible usar células que expresan la recombinasa cuyos sitios diana se encuentran flanqueando la región esencial del genoma del adenovirus auxiliar, de forma que, además de la recombinasa producida por el propio adenovirus auxiliar, exista una cantidad adicional de recombinasa producida por la propia célula de forma que se obtenga una mayor eficacia en la eliminación de todos los genomas replicativos de los adenovirus auxiliares. Preferiblemente, la invención contempla el uso de líneas celulares establecidas que expresan la recombinasa Cre de forma estable tales como la línea 293Cre (Parks *et al.*, *supra.*). La recombinasa que expresa la célula puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o puede encontrarse bajo el control de un promotor inducible que puede ser el mismo o distinto que el utilizado para regular la expresión de la recombinasa codificada por el adenovirus auxiliar. Los promotores constitutivos e inducibles que pueden ser utilizados para regular la expresión de la recombinasa codificada por la célula son los mismos que se han mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante segundo método de la invención) para la generación de un vector adenoviral de alta capacidad que expresa un gen de interés que comprende las etapas de

- (i) contactar una célula con un adenovirus cuyo genoma comprende un gen de interés y que carece de la secuencia que codifica al menos una de las proteínas esenciales para la replicación o para el empaquetamiento de dicho adenovirus o con un polinucleótido que comprende el genoma de dicho adenovirus en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula del genoma de dicho adenovirus o del polinucleótido que comprende dicho genoma,
 - (ii) contactar dicha célula con un segundo componente seleccionado del grupo de:
 - (a) un polinucleótido que comprende:
 1. una región que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde dicha región se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible y
 2. una señal de empaquetamiento adenoviral ψ flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas para la recombinasa codificada por la secuencia a) en donde dichas secuencias de reconocimiento se encuentran orientadas de forma que se produzca la escisión de la señal de empaquetamiento ψ en presencia de dicha recombinasa,
 - (b) un vector adenoviral que comprende un polinucleótido según (a)
 - (c) una partícula adenoviral que comprende un polinucleótido según (a)
- en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula de dicho polinucleótido, de dicho vector adenoviral o del genoma de dicha partícula adenoviral,
- (iii) mantener la célula en condiciones adecuadas para la expresión de las proteínas codificadas por los genomas de ambos virus, para la replicación de los genomas de ambos adenovirus y para la expresión de la recombinasa codificada por el polinucleótido, vector o adenovirus usado en la etapa (ii) y
 - (iv) recuperar el adenovirus de alta capacidad del cultivo de las células.

La etapa (i) del segundo método de la invención es similar a la primera etapa del primer método de la invención, puesto que consiste en poner en contacto una célula con un genoma adenoviral, en donde dicho genoma adenoviral puede estar en forma de un polinucleótido desnudo o formando parte de una partícula adenoviral. En el primer caso, la etapa (i) del método implica el uso de métodos conocidos para que el polinucleótido acceda al interior celular tal y como se ha descrito anteriormente. En el segundo caso, es suficiente con poner en contacto la partícula adenoviral con la célula y, si esta expresa las moléculas de superficie que actúan como receptores para los adenovirus, estos incorporarán su genoma en la célula de forma espontánea. En una forma preferida de realización, el adenovirus que se utiliza en la etapa (i) es un adenovirus *gutless* o de alta capacidad.

La etapa (ii) del segundo método de la invención puede llevarse a cabo simultáneamente, antes o después que la etapa (i), aunque conviene que se lleve cabo con posterioridad para evitar que el efecto citopático causado por la expresión de las proteínas estructurales y reguladoras del adenovirus impida la replicación eficiente del genoma del adenovirus que comprende un gen de interés. La entrada en la célula del genoma del adenovirus auxiliar tiene lugar bien mediante técnicas conocidas de transfección si dicho genoma se encuentra como polinucleótido desnudo o bien siguiendo la ruta natural de infección de los adenovirus si dicho genoma se aporta formando una partícula adenoviral.

La etapa (iii) del segundo método de la invención comprende mantener las células en condiciones adecuadas para permitir la expresión por medio de la maquinaria de transcripción/traducción celular de las proteínas estructurales codificadas por el genoma del adenovirus auxiliar que se ha introducido en la etapa (ii) y para permitir la replicación del genoma del adenovirus que comprende el gen de interés. En esta etapa es esencial garantizar la expresión y actividad en la célula de la recombinasa codificada por el genoma del adenovirus auxiliar, de forma que se produzca la escisión de la región de dicho genoma esencial para su replicación y/o encapsidación y se reduzca al máximo la formación de partículas adenovirales que comprendan el genoma del adenovirus auxiliar. En una forma preferida de realización, la etapa (iii) se lleva a cabo en presencia de un inductor transactivador específico del promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio. Dicho transactivador puede ser aportado por la propia célula en la que se lleva a cabo el proceso de empaquetamiento si el polinucleótido que la codifica se encuentra integrado en el genoma de dicha célula de forma estable o, alternativamente, en una forma preferida de realización, es el propio genoma del adenovirus auxiliar el que codifica para dicho transactivador. En una forma de realización aún más preferida, el transactivador se expresa a partir del genoma del adenovirus auxiliar y de la célula empaquetadora. En una forma aún más preferida de realización, dicho transactivador requiere de la presencia de un ligando para ejercer su actividad transactivadora, en cuyo caso la etapa (iii) del método se lleva a cabo en presencia de dicho ligando para garantizar la máxima expresión de la recombinasa. En una forma de realización aún más preferida, el transactivador es el transactivador rtTA-M2, formado por el represor de tetraciclina unido a la proteína VP16 del virus del herpes simplex, en cuyo caso la etapa (iii) del método se lleva a cabo en presencia de un análogo de tetraciclina, preferiblemente doxiciclina.

La figura 3 indica en el panel derecho el mecanismo por el que se produce la activación de la expresión de la recombinasa en presencia de doxiciclina.

Según se expuso anteriormente, cualquier recombinasa es en principio adecuada para la eliminación de la señal de empaquetamiento en el virus auxiliar siempre que dicha señal de empaquetamiento se encuentre flanqueada por los sitios dianas de dicha recombinasa en la orientación adecuada para producir la escisión de la secuencia comprendida entre ambas señales. En una forma preferida de realización, la recombinasa codificada por el adenovirus auxiliar es la recombinasa Cre o una proteína de fusión que comprende dicha recombinasa. Una forma adicional de garantizar que la recombinasa es inactiva cuando no se utiliza en el proceso de empaquetamiento de adenovirus de interés es el uso de recombinasa cuya translocación al núcleo depende de la presencia de un ligando que se puede añadir exógenamente, y que se une a proteínas celulares que impiden su función en ausencia de un ligando específico. Así, en una forma preferida de realización, la invención contempla el uso de una proteína de fusión formada por la recombinasa Cre y al menos una región de unión a ligando del receptor de estrógenos. Este tipo de proteínas de fusión se localizan por defecto en el citoplasma y se unen a ciertas proteínas celulares, y son, por tanto, incapaces de ejercer su función recombinasa. Sin embargo, en presencia de un estrógeno o un derivado (por ejemplo tamoxifeno), la proteína de fusión se libera de la unión a dichas proteínas celulares y se transloca al núcleo donde ejerce su función recombinasa. En una forma de realización aún más preferida, la recombinasa codificada por el genoma del adenovirus recombinante es la recombinasa MerCreMer, formada por la recombinasa Cre con una región mutada de unión a ligando del receptor de estrógenos en posición N-terminal y en posición C-terminal.

La figura 6 indica de forma esquemática el mecanismo por el que se produce expresión y activación de la recombinasa en presencia de doxiciclina y tamoxifeno.

La etapa (iv) del segundo método de la invención comprende la purificación de los adenovirus *gutless* formados durante la etapa (iii) y se lleva a cabo esencialmente de la misma forma que se purifican los adenovirus auxiliares en la etapa (iii) del primer método de la invención, según se describió en detalle anteriormente.

El experto en la materia apreciará que los adenovirus que comprenden un gen de interés purificados de acuerdo al segundo método de la invención pueden ser utilizados en sucesivas rondas de propagación mediante la puesta en contacto de nuevo de dichos adenovirus con una célula seguido de la puesta en contacto de dicha célula con otra dosis de adenovirus auxiliares obtenidos mediante el primer método de la invención. De esta manera se puede repetir el proceso de la invención sucesivas veces obteniendo un número mayor de partículas adenovirales en cada ciclo.

La invención se ilustra a continuación en base a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Construcción del virus AdTetCre

Construcción del cassette de expresión inducible de MerCreMer

El sistema inducible consta de dos unidades transcripcionales independientes. Una de ellas codifica para la recombinasa bajo el control de un promotor inducible, y la otra codifica para un transactivador bajo el control de un promotor constitutivo (promotor del gen PGK murino). Para obtener la primera unidad se partió del plásmido pO₇Pal-luc, previamente descrito (Zabala y cols., 2004, Cáncer Res. 64:2799-2804). Este plásmido contiene 7 sitios de unión para el transactivador y una región de 196 pb del extremo 5' del promotor de la albúmina murina controlando la expresión del gen de la luciferasa, y una señal de poli-adenilación procedente del virus SV40. En este plásmido se introdujo la secuencia codificante para la proteína de fusión MerCreMer procedente del plásmido pANMerCreMer (Dr. M. Reth, Max-Planck Institute for Immunobiology, Freiburg, Germany) (Verrou y cols., 1999, Biol Chem. 380:1435-8). El clonaje se realizó utilizando los sitios de restricción HindIII del plásmido pANMerCreMer y los sitios HindIII y XbaI del plásmido pO₇Pal-luc, dando lugar al plásmido palbMerCreMer. Para la obtención de la segunda unidad, se utilizó el promotor del gen fosfoglicerato quinasa murino (PGK) controlando la expresión del transactivador rtTA2S-M2 (Zabala y cols., 2004, *supra.*), y una señal de poli-adenilación sintética basada en el gen de la beta-globina de ratón (Levitt *et al.*, 1989, Genes Dev. 3:1019-25). El plásmido resultante se denominó pGKrtTA. Ambas unidades transcripcionales se fusionaron en un único plásmido llamado prtTAMerCre mediante subclonaje de un fragmento XhoI-SaII del plásmido palbMerCreMer en el plásmido pGKrtTA.

25 Construcción del genoma del vector AdTetCre

En primer lugar se obtuvo mediante PCR una secuencia que comprende el ITR izquierdo de Adenovirus y la señal de empaquetamiento flanqueada por sitios loxP. Para ello se utilizó como molde el plásmido pGS102, que contiene el genoma de un adenovirus auxiliar (E. Ayuso, Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. CBATEG. 2006). Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Oligonucleótido	Secuencia	SEQ ID NO
35 5Ad5St	TAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTG	1
AdpTGC-10	TGACTAGTATAAGCGGCCGCAGCAGATACGGGATATC	2

Este fragmento se introdujo en el plásmido pShuttle (He y cols., 1998) para dar lugar al plásmido pShut-VH. A continuación se cambió la orientación de las secuencias bacterianas incluidas en el plásmido (resistencia a kanamicina y origen de replicación) mediante digestión con el enzima PacI y re-ligación de los fragmentos. El plásmido resultante se llamó pShutLoxP. Posteriormente se incluyó un sitio de restricción único para el enzima SmaI entre las posiciones NotI y SalI del plásmido. Para ello se construyó un cassette mediante hibridación de los oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia	SEQ ID NO
45 5SwaB	CTGACTGAGCGGCCGCATTTAAATGTCGACACTTCAC	3
3SwaB	GTGAAGTGTGCGACATTTAAATGCGGCCGCTCAGTCAG	4

se digirió con los enzimas NotI y SalI y se ligó en el plásmido pShutLoxP. El plásmido resultante se llamó pShutSwa. A continuación se utilizó este plásmido como molde para amplificar el fragmento que contiene la parte izquierda del genoma adenoviral (incluyendo la secuencia de encapsidación flanqueada por sitios LoxP y el sitio de reconocimiento de SmaI). Los oligonucleótidos utilizados fueron

Oligonucleótido	Secuencia	SEQ ID NO
60 5ClaITR	ACTGACATCGATTTAATTAACATCATCAATAATATACC	5
3ClaLoxP	TAGATTATCGATTCTTAACACGCCCAGATC	6

Este fragmento se introdujo en el sitio ClaI del plásmido pAdEasy1 (He y cols., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:2509-14). De esta manera se obtuvo el plásmido pAdLoxP2, que contiene el genoma de un vector adenoviral de primera generación (con delección de las regiones E1 y E3) en el que la señal de encapsidación está flanqueada por sitios LoxP. En este plásmido se introdujo el cassette de expresión inducible de la proteína MerCreMer procedente del plásmido prtTAMerCre, utilizando el sitio único SmaI. Este nuevo plásmido (pAdLoxPMerCre) debería contener la

secuencia del nuevo adenovirus auxiliar auto-inactivable, pero se observó que la secuencia de encapsidación se escinde espontáneamente durante el proceso de amplificación de este plásmido en *E. Coli*, probablemente por expresión de la recombinasa MerCreMer. Para solucionar este problema, se siguió una estrategia basada en la recombinación homóloga en células de mamífero. Para ello se introdujo en el plásmido pShutSwa un fragmento SnaBI-SapI del plásmido prtTAMerCre que contiene el cassette de expresión inducible, pero con la secuencia codificante para MerCreMer truncada. De este modo se evita que en el mismo plásmido co-existan los sitios LoxP y la capacidad de expresar actividad recombinasa. El plásmido resultante se llamó pShutMer. Para producir el nuevo virus auxiliar, se co-transfectaron los plásmidos pAdLoxPMerCre y pShutMer en células 293tTS. Estos plásmidos poseen amplias zonas de homología, de modo que se facilita la recombinación que puede dar lugar a un genoma viral funcional (figura 7). Cuando se observó efecto citopático evidente en los cultivos celulares (aproximadamente 10-15 días después de la transfección) se lisaron las células y se verificó la estructura del virus mediante PCR y secuenciación de las zonas más importantes. Se obtuvieron clones individuales mediante dilución límite en células 293tTS. El nuevo adenovirus auxiliar auto-inactivable se llamó AdTetCre.

15 *Amplificación, purificación y cuantificación del virus*

El virus AdTetCre se amplificó en células 293tTS. Una vez observado efecto citopático en la mayoría de las células, se recogieron junto con el medio de cultivo y se centrifugaron. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron de nuevo las células en un volumen más pequeño de Tris 10 mM, pH 8.1. A continuación se lisaron mediante 3 ciclos de congelación y descongelación, y el virus liberado se purificó mediante un doble gradiente de cloruro de cesio. Se recogió la banda correspondiente al virus y se eliminó la sal mediante una columna de exclusión de tamaño (Sephadex). La cuantificación del virus en unidades infectivas se realizó mediante el kit comercial AdenoX rapid titer kit (BD Biosciences), según las especificaciones del fabricante.

25 *Expresión de la proteína MerCreMer*

Células 293tTS se sembraron en multipocillo de 6 pocillos ($7,5 \times 10^5$ células/pocilio). A las 24 horas se les realizó un pretratamiento con tamoxifeno ($0.8 \mu\text{M}$) y Doxyciclina (100 ng/ml), o permanecieron sin tratamiento. A las 48 horas se infectaron con el virus AdTetCre a una MOI de 2 virus/célula manteniendo durante la infección el tratamiento con tamoxifeno y Doxyciclina. Después de 48 horas se recogieron las células. En el caso del control de células 293 se cultivaron en multipocillo de 6 y se recogieron al mismo tiempo que las infecciones anteriores. Lo mismo para el caso del control de las células 293Cre4. Para el estudio de la cinética de expresión de la proteína MerCreMer, las células se trataron de la misma manera, y se recogieron a distintos tiempos (6 h, 12 h, 36 h y 48 h). Para obtener un control positivo de la proteína MerCreMer se transfectaron células 293tTS con el plásmido pANMerCreMer. La transfección se realizó con 20 μl de lipofectamina 2000 y 15 μg del plásmido sin digerir. A las 48 horas se recogieron las células. En todos los casos las células se lisaron con una solución compuesta por TNE buffer (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl) suplementado con 1% Igepal y una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Tablets, Roche) durante 15 min en hielo y posteriormente se sonicaron y se centrifugaron a 15.000 g durante 45 min a 4°C. Se determinó la cantidad de proteína mediante el método Bradford y a continuación se realizó separación electroforética de las proteínas mediante SDS-PAGE en un gel del 8% en el que se habían cargado 20 μg de proteína por muestra. La proteína Cre o MerCreMer se detectó mediante Western Blotting utilizando una dilución 1:10.000 del anticuerpo primario específico contra Cre (Novagen) y una dilución 1:5.000 del anticuerpo secundario anti-conejo de cabra unido a peroxidasa (BioRad). El revelado se realizó mediante Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer).

45 *Control de la producción viral mediante Doxyciclina y Tamoxifén*

Las distintas células (293, 293tTS o 293Cre4) se sembraron en placas de 12 pocillos con 4×10^4 células por pocilio y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS, Glutamina, Penicilina y Estreptomicina. Al cabo de 24 horas, las células recibieron un tratamiento con doxyciclina (100 ng/ml) tamoxifeno ($0.8 \mu\text{M}$) o ambos a la vez, o permanecieron sin tratamiento. La infección se llevó a cabo 24 horas después con una MOI de 2 virus/célula de virus auxiliar AdTetCre o AdLC8cluc, y 48 horas después se recogieron las células. La cuantificación de la cantidad de virus infectivo se realizó mediante AdenoX rapid titer kit (BD Biosciences), según las especificaciones del fabricante.

55 *Protocolo de producción de HC-Ad*

El plásmido pKCZ, que contiene el genoma del HC-Ad KCZ, se digirió con la enzima de restricción PmeI para linearizarlo y eliminar la resistencia al antibiótico. Posteriormente se precipitó añadiendo acetato sódico (300 mM) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La muestra se mantuvo a -20°C durante al menos 1 hora, y después se centrifugó a 11.000 g durante 30 minutos a 4°C, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se secó al aire. Se resuspendió en agua y se utilizaron 15 μg para transfectar 1×10^6 células 293Cre4 en una placa de 60 mm que habían sido previamente tratadas durante 24 horas con tamoxifeno y doxyciclina. La transfección se llevó a cabo utilizando 20 μl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). A las 6 horas se les realizó un cambio de medio, añadiéndole medio DMEN con un 2% FBS y el virus AdTetCre a una MOI de 1 virus/célula. Esta MOI se determinó en un experimento previo donde se ensayó la cantidad de virus necesaria para producir el 90% de efecto citopático a las 48 horas de infección. La infección se dejó progresar durante 48 horas y luego se recogieron las células en 200 μl de Tris 10 mM, pH 8.1. Esta etapa de transfección-infección se denomina fase 0. El virus producido en esta fase se liberó de las células mediante 3 ciclos de congelación/descongelación y se utilizaron 150 μl del lisado para infectar una nueva placa de células 293Cre4 junto

con una MOI 1 del virus auxiliar AdTetCre. Como en el caso anterior, las células fueron pretratadas durante 24 horas con Doxiciclina y tamoxifeno. De esta manera se realizan los llamados pases 1-3. En el pase 4 se infectan 2 placas de 150 mm con 1×10^7 células 293Cre4 en cada una, en el pase 5 son 8 placas de 150 mm, y el pase final de la producción a mediana escala consiste en 30 placas de 150 mm. El virus producido se purificó mediante un doble gradiente de Cloruro de Cesio y se eliminó la sal de la preparación mediante una columna de exclusión de tamaño (Sephadex). En cada uno de los pases se cuantificó la cantidad de AdTetCre mediante el kit comercial AdenoX rapid titer kit (BD Biosciences), según las especificaciones del fabricante. El HC-Ad KCZ se cuantificó mediante tinción con X-Gal.

La producción en células 293 se realizó de la misma manera, llegando hasta pase 4. La producción con el virus auxiliar AdLC8cluc se realizó en células 293Cre4 sin tratamiento con doxiciclina y tamoxifeno, llegando hasta pase 6.

Ejemplo 2

Construcción de un sistema de plásmidos que permite la expresión de Cre de forma regulada por doxiciclina y tamoxifeno

Para lograr el control de la expresión de Cre, se utilizó un sistema inducible del tipo “tet-on” que ha sido previamente optimizado (Zabala y cols., 2004, *supra.*). El sistema se basa en la expresión constitutiva de una proteína transactivadora (rtTA-M2) que dimeriza en presencia de Doxiciclina añadida exógenamente, adoptando una conformación activa capaz de unirse a promotores que contengan las secuencias de unión “tet” (figura 2). De esta manera se consigue que el gen que esté bajo el control del promotor inducible (con sitios “tet”) se exprese sólo en presencia de Doxiciclina, de forma dependiente de dosis. En este caso, se ha construido un plásmido donde el transactivador rtTA-M2 se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo (fosfoglicerato quinasa, PGK), para asegurar que pueda ser activo en cualquier célula empaquetadora de HC-Ad. Por su parte, Cre se encuentra bajo el promotor inducible formado por varios sitios “tet” unidos a un promotor mínimo (en este caso el de la albúmina). A continuación se procedió a la fusión de ambas construcciones para obtener un plásmido con el sistema completo de expresión inducible de Cre (figura 2).

Para asegurar que la expresión basal de Cre no impida la producción del nuevo virus auxiliar, se han llevado a cabo dos estrategias complementarias.

Por un lado, se han generado unas células que expresan de modo constitutivo el represor tTS. La proteína tTS es capaz de unirse al promotor inducible en ausencia de Doxiciclina, y bloquear la transcripción. Cuando se añade el inductor Doxiciclina, tTS cambia de conformación y deja de unirse al promotor, dejando vía libre para que el transactivador rtTA-M2 se una y active la expresión de Cre (figura 3). Por lo tanto, el método se basa en dos tipos de células empaquetadoras: 293 que expresan tTS para la producción del adenovirus auxiliar, y las células 293 (con o sin expresión constitutiva de Cre y/o rtTA-M2) para la producción de los HC-Ad. Se obtuvo un plásmido comercial en el cual el gen que codifica para tTS se expresa bajo el control del promotor viral de CMV. Dado que este promotor puede sufrir silenciamiento a largo plazo, fue sustituido por el promotor EFla, que obtiene una expresión más mantenida en líneas estables. En la figura 4 se muestra el resultado de una RT-PCR para comprobar la expresión del gen introducido después de la selección de los clones en células 293.

Por otro lado, se ha obtenido una secuencia que codifica para una proteína de fusión que consiste en la recombinasa Cre unida por su extremo carboxi y aminoterminal a sendos receptores de estrógenos mutados. Se ha descrito que esta proteína (llamada MerCreMer) sólo presenta la actividad recombinasa propia de Cre en presencia de tamoxifeno (Verrou y cols., 1999, *Biol Chem.* 380:1435-8). De esta manera, en el caso de que el sistema inducible tet-on no consiga un control eficiente de la expresión de Cre en ausencia de Doxiciclina, la enzima será inactiva y permitirá la producción del virus auxiliar. Por el contrario, a la hora de producir el HC-Ad se añadirá tamoxifeno en las células sin tTS tratadas con doxiciclina, de modo que la activación del sistema será máxima.

Una vez completada la construcción de los plásmidos que integran el sistema de regulación para las recombinasas Cre o MerCreMer, se verificó el funcionamiento del sistema inducible. En la figura 5 se muestra como ejemplo el control de la expresión de Cre en células 293. Cuando se co-transfectan los plásmidos individuales que codifican para el transactivador y para Cre con el promotor inducible, se obtiene expresión de la recombinasa en presencia de doxiciclina, mientras que ambos plásmidos por separado no expresan. El plásmido que contiene el sistema completo también produce Cre, aunque en menor medida. En la figura 5B se muestra como este último plásmido sólo expresa cantidades apreciables de Cre cuando las células se tratan con doxiciclina.

Ejemplo 3

Vectores adenovirales auxiliares que expresan Cre de forma regulada por doxiciclina y tamoxifeno

A continuación se inició el proceso de construcción del vector auto-inactivable portador de la recombinasa MerCreMer, mediante incorporación de los distintos elementos en un plásmido que contiene el genoma de un vector adenoviral de primera generación. La estructura genómica de este vector se ilustra en la figura 6, junto con el mecanis-

mo de funcionamiento esperado. Sin embargo, el sistema completo no se puede obtener en un único plásmido, ya que se observó escisión de la secuencia de empaquetamiento flanqueada por sitios loxP en el transcurso de la amplificación de los plásmidos en *E. Coli*. Por ello el paso final para la obtención del nuevo vector consistió en la co-transfección en células 293tTS de dos plásmidos que restituyen el genoma completo después de producirse una recombinación homóloga en las células (figura 7). El virus se amplificó en células 293tTS y se purificó siguiendo el mismo procedimiento que cualquier otro vector adenoviral de primera generación.

Una vez obtenido el virus, se comprobó mediante Western Blot que es capaz de expresar la proteína MerCreMer de modo inducible por Doxyciclina (figura 8). A continuación se procedió al estudio de su comportamiento en presencia de Doxyciclina y tamoxifeno en distintos tipos de células. Para ello se infectaron células 293, 293tTS o 293 que expresan de modo constitutivo la recombinasa Cre (293Cre4) (Parks y cols., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:13565-70), en presencia o ausencia de los citados tratamientos. Al cabo de 48 horas de infección se cuantificó la cantidad de virus infectivo producido en cada caso. Como puede comprobarse en la figura 9, en las células 293tTS se produce una drástica reducción de la producción viral sólo en presencia de doxyciclina y tamoxifeno, lo cual es consistente con la inhibición esperada de la encapsidación del virus debida a la escisión de su secuencia de encapsidación. En las células 293, en las que el nivel de expresión basal de MerCreMer puede ser más elevado, la adición independiente de Doxyciclina o tamoxifeno sí produjo una disminución relativa de la producción de virus, aunque nuevamente el tratamiento combinado es el que consigue una reducción más llamativa. Cuando se utilizan las células 293Cre4, como es esperable la producción viral es baja independientemente de la activación del sistema inducible. Para demostrar la especificidad del sistema, se realizó un estudio análogo, esta vez comparando el virus AdTetCre con un virus auxiliar estándar (AdLC8cluc), que tiene la señal de encapsidación flanqueada por sitios loxP pero no expresa ninguna recombinasa (Parks *et al.*, 1996, *supra.*). Como puede comprobarse en la figura 10, el tratamiento con tamoxifeno y Doxyciclina no produjo un cambio significativo en los niveles de producción del virus. Solamente cuando se utilizan las células 293Cre4 el empaquetamiento del virus se reduce. En cambio, se confirma una drástica reducción en el caso de AdTetCre, con unos niveles incluso inferiores a los observados con AdLC8cluc en las células 293Cre4. Para demostrar que esta reducción es debida a la escisión de la secuencia de empaquetamiento, se amplificó mediante PCR la región inicial de los virus AdTetCre presentes en células 293 tratadas con Doxyciclina y tamoxifeno. Como puede apreciarse en la figura 11A, el fragmento amplificado es menor que el correspondiente al genoma sin modificar, y el tamaño es compatible con la pérdida completa de la secuencia de empaquetamiento. Además, este punto se confirmó mediante secuenciación. En la figura 11B se muestra como la secuencia de empaquetamiento se pierde en el caso de un virus auxiliar estándar (AdLC8cluc) cuando infecta las células 293Cre4. Puede apreciarse además como esta escisión parece no ser completa, contrariamente al virus AdTetCre.

35 Ejemplo 4

Producción de adenovirus gutless mediante la utilización del adenovirus auxiliar auto-inactivable

Una vez comprobado que el virus AdTetCre es inactivable de modo inducible (auto-inactivable), se procedió a estudiar su capacidad para funcionar como virus auxiliar en el proceso de producción de un HC-Ad. Para ello se siguió un protocolo estándar de transfección del plásmido codificante para el HC-Ad (en este caso KCZ, que expresa el gen LacZ) y posterior infección con el virus auxiliar. A continuación se siguen sucesivos pasos de amplificación en los que se utiliza el HC-Ad producido en el paso anterior para infectar una nueva placa de células, junto con la adición de nuevo virus auxiliar. El tamaño y el número de placas se incrementan progresivamente. Este proceso se realizó tanto en células 293 como en células 293Cre4 con el virus AdTetCre como auxiliar. Para comparar con el método estándar, se utilizó de la misma manera el virus auxiliar AdLC8cluc en células 293Cre4. En cada paso se cuantificó la cantidad de unidades infectivas correspondientes al HC-Ad y al virus auxiliar. Como puede comprobarse en la figura 12A, la producción de HC-Ad utilizando el virus AdTetCre se incrementó progresivamente en los sucesivos pasos realizados en células 293Cre4, mientras que la contaminación con adenovirus auxiliar se mantuvo siempre muy por debajo. En el último pase realizado en este ejemplo (pase 6) se obtuvo una cantidad de adenovirus de alta capacidad de 1.2×10^{11} ui totales, con una contaminación de adenovirus auxiliar inferior al 0.05%. Este rendimiento y pureza es considerado aceptable para una producción de tamaño mediano de HC-Ad. En cambio, cuando se utilizó el virus AdLC8cluc el grado de contaminación con este virus se incrementó a lo largo de los pasos, llegando a exceder la cantidad de vector de alta capacidad (figura 12C). Aunque en otras ocasiones esta contaminación es menor y sí es posible utilizar el método estándar para la producción de HC-Ad, la excesiva acumulación de virus auxiliar ha sido descrita con frecuencia e indica la falta de robustez de este método. Respecto a la producción en células 293 con el virus AdTetCre, el grado de contaminación también fue demasiado elevado (figura 12B). Esto indica que la recombinasa Cre expresada por las células empaquetadoras colabora con la recombinasa MerCreMer expresada por el virus para lograr un efecto óptimo. Es posible que esta expresión constitutiva sea importante para asegurar la presencia de la recombinasa en momentos iniciales tras la infección con el virus auxiliar. En varios experimentos sucesivos llevados a cabo hasta el momento, la cantidad de virus AdTetCre ha permanecido siempre por debajo de la cantidad de virus de alta capacidad cuando se han utilizado las células 293Cre4, lo cual sugiere una mayor fiabilidad de este método de producción frente a la tecnología basada en adenovirus auxiliares convencionales.

65

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende:

- a) una región que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde dicha región se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible y
- b) una región esencial para la replicación y/o para el empaquetamiento del genoma adenoviral flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas para la recombinasa codificada por la secuencia a) en donde dichas secuencias de reconocimiento se encuentran orientadas de forma que se produzca la escisión de dicha región esencial en presencia de dicha recombinasa.

2. Un polinucleótido según la reivindicación 1 en donde la región (b) esencial para el empaquetamiento o la replicación del genoma adenoviral es la señal de empaquetamiento Ψ .

3. Un polinucleótido según las reivindicaciones 1 ó 2 que comprende, adicionalmente, una secuencia que codifica un activador transcripcional que es capaz de activar de forma específica el promotor que regula la expresión de la recombinasa codificada por la secuencia (a) en presencia de un ligando de dicho activador transcripcional.

4. Un polinucleótido según la reivindicación 3 en donde dicho activador transcripcional es un transactivador dependiente de un análogo de tetraciclina.

5. Un polinucleótido según la reivindicación 4 en donde el activador transcripcional es el transactivador rtTA-M2.

6. Un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la recombinasa es Cre o una proteína de fusión que comprende la secuencia de la recombinasa Cre.

7. Un polinucleótido según la reivindicación 6 en donde la recombinasa comprende, adicionalmente, un dominio de unión a hormonas o una secuencia de localización nuclear activable, preferiblemente, el dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos.

8. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un vector de expresión según la reivindicación 8 en donde dicho vector es un vector adenoviral.

10. Una partícula adenoviral que comprende la secuencia de un polinucleótido según las reivindicaciones 1 a 7.

11. Un sistema para la replicación y empaquetamiento de un adenovirus auxiliar autoinactivante, que comprende:

- a) un polinucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7, o un vector de expresión según las reivindicaciones 8 ó 9, o una partícula adenoviral según la reivindicación 10; y
- b) una célula eucariota.

12. Un sistema según la reivindicación 11 en donde la célula que forma el componente (b) comprende un represor transcripcional específico para el promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio.

13. Un sistema según la reivindicación 12, en donde el represor transcripcional es activo en ausencia de un ligando que es capaz de promover la expresión de la recombinasa específica de sitio.

14. Un método para la obtención de un adenovirus auxiliar autoinactivante que comprende

- (i) contactar una célula con un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector de expresión según las reivindicaciones 8 ó 9 o una partícula adenoviral según la reivindicación 10 y, opcionalmente, con uno o varios polinucleótidos que codifican las proteínas adenovirales necesarias para el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula del genoma adenoviral o del polinucleótido que comprende dicho genoma,
- (ii) mantener la célula en condiciones adecuadas para permitir el empaquetamiento y replicación del adenovirus en la célula y para impedir la expresión de la recombinasa específica de sitio y
- (iii) recuperar los adenovirus del medio.

ES 2 337 973 B2

15. Un método según la reivindicación 14 en donde la célula comprende un represor transcripcional específico para el promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio en donde dicho represor es activo en ausencia de un análogo de un ligando capaz de activar el promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio.

5 16. Un método según la reivindicación 15 en donde dicho represor transcripcional es el represor tTS dependiente de doxiciclina.

17. Un adenovirus auxiliar obtenido según el método de la reivindicación 16.

10 18. Uso de un polinucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7 o de un vector según las reivindicaciones 8 ó 9 o de una partícula adenoviral según la reivindicación 10 que comprende dicho polinucleótido para la producción y empaquetamiento de adenovirus de alta capacidad.

15 19. Un sistema para la producción de un adenovirus recombinante de alta capacidad que comprende

(a) un polinucleótido según una de las reivindicaciones 1 a 7, o un vector de expresión según las reivindicaciones 8 ó 9, o una partícula adenoviral según la reivindicación 10;

20 (b) un adenovirus o un polinucleótido que comprende el genoma de dicho adenovirus, en donde dicho genoma comprende un gen de interés y carece de la secuencia que codifica al menos una de las proteínas esenciales para la replicación o al menos una de las proteínas esenciales para el empaquetamiento de dicho adenovirus y

25 (c) una célula eucariota.

20. Un sistema según la reivindicación 19 en donde la célula eucariota comprende un polinucleótido que expresa la recombinasa específica de sitio que está codificada por el componente (a) del sistema.

30 21. Un sistema según la reivindicación 20 en donde la región que codifica «a la recombinasa específica de sitio se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible.

22. Un método para la generación de adenovirus de alta capacidad que expresa un gen de interés que comprende las etapas de

35 (i) contactar una célula con un adenovirus en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula del genoma de dicho adenovirus o del polinucleótido que comprende dicho genoma,

40 (ii) contactar dicha célula con un segundo componente seleccionado del grupo de:

(a) un polinucleótido que comprende:

45 1. una región que codifica una recombinasa específica de sitio, en donde dicha región se encuentra bajo control operativo de un promotor inducible y

2. una señal de empaquetamiento adenoviral ψ flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas para la recombinasa codificada por la región del apartado 1. anterior, en donde dichas secuencias de reconocimiento se encuentran orientadas de forma que se produzca la escisión de la señal de empaquetamiento ψ en presencia de dicha recombinasa,

50 (b) un vector adenoviral que comprende un polinucleótido según (a) y

(c) una partícula adenoviral que comprende un polinucleótido según (a)

55 en condiciones adecuadas para que se produzca la entrada en la célula de dicho polinucleótido, de dicho vector adenoviral o del genoma de dicha partícula adenoviral,

60 (iii) mantener la célula en condiciones adecuadas para la expresión de las proteínas codificadas por los genomas de ambos virus, para la replicación de los genomas de ambos adenovirus y para la expresión de la recombinasa codificada por el polinucleótido, vector o adenovirus usado en la etapa (ii) y

(iv) recuperar el adenovirus de alta capacidad del cultivo de las células.

65 23. Un método según la reivindicación 22 en donde el polinucleótido definido en (a) y/o la célula comprende, adicionalmente, una secuencia que codifica un transactivador específico del promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio.

ES 2 337 973 B2

24. Un método según la reivindicación 23 en donde las etapas (i) y/o (ii) se llevan a cabo en presencia de un ligando que es capaz de unirse y activar el transactivador específico del promotor que regula la expresión de la recombinasa específica de sitio.

5 25. Un método según la reivindicación 24 en donde dicho transactivador es rtTA-M2 y en donde dicho ligando es doxiciclina.

26. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 en donde la célula comprende una secuencia que codifica una recombinasa específica de sitio en donde dicha recombinasa es la misma que está codificada por el polinucleótido definido en (a).
10

27. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 en donde la recombinasa específica de sitio es Cre o una proteína de fusión que comprende la secuencia de la recombinasa Cre.

15 28. Un método según la reivindicación 27 en donde la recombinasa es merCremer.

29. Un método según la reivindicación 28 en donde la etapa (i) y/o (ii) se lleva a cabo en presencia de tamoxifeno.

30. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29 que comprende repetir al menos una vez las etapas (i) a (iv) utilizando en la etapa (i) de cada ciclo el adenovirus recuperado en la etapa (iv) del ciclo anterior y, opcionalmente, añadiendo una nueva dosis de adenovirus auxiliar en las etapas (i) de cada ciclo.
20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

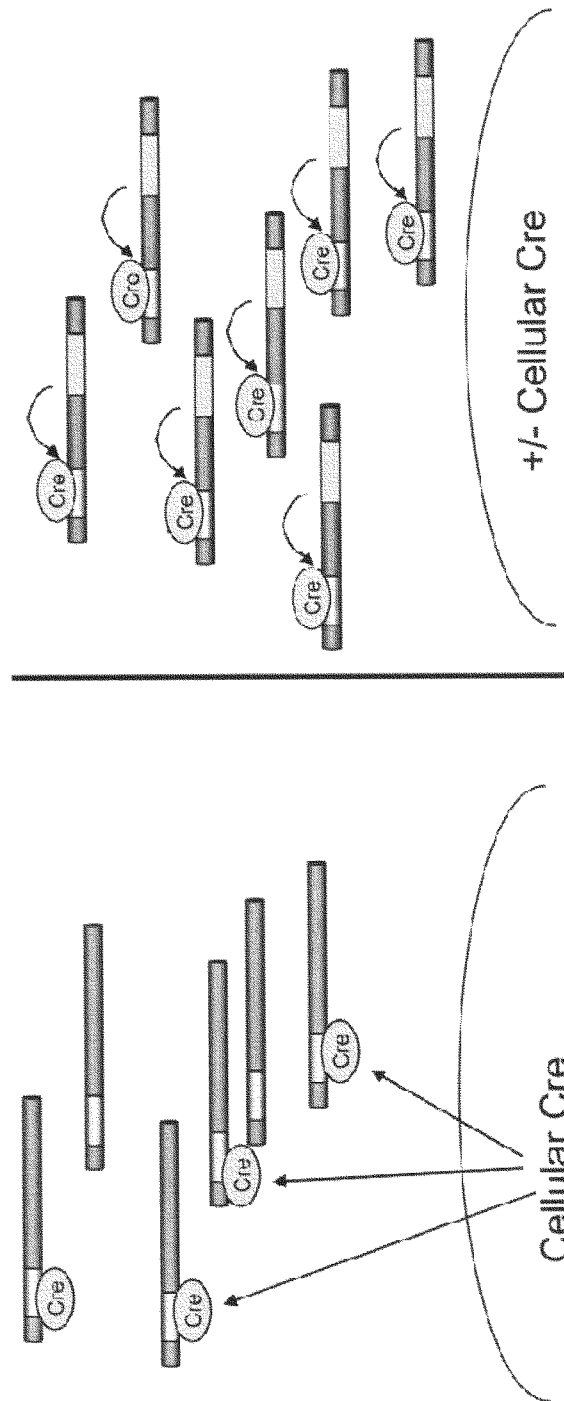


FIGURA 1

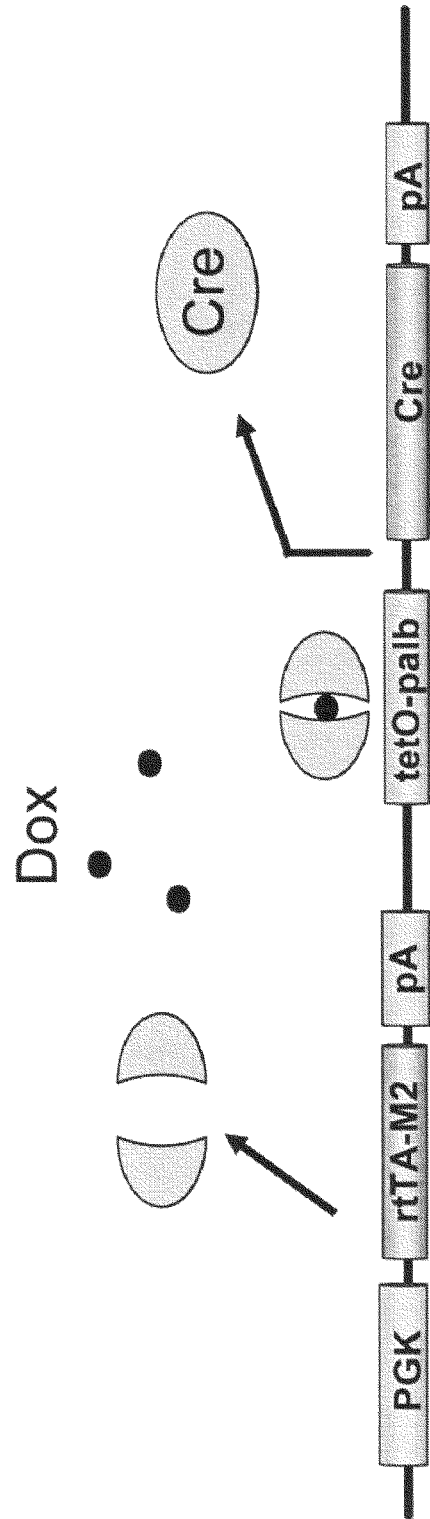


FIGURA 2

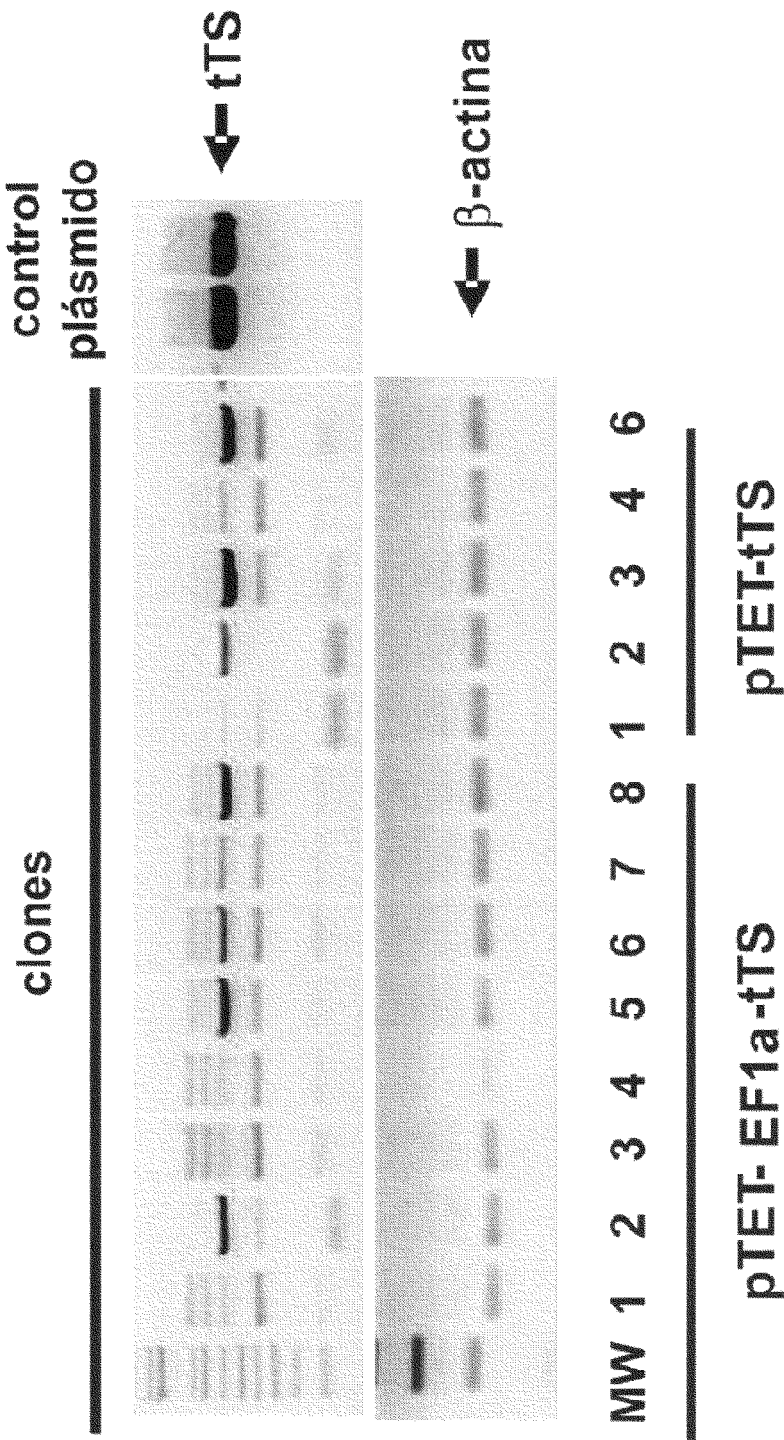


FIGURA 4

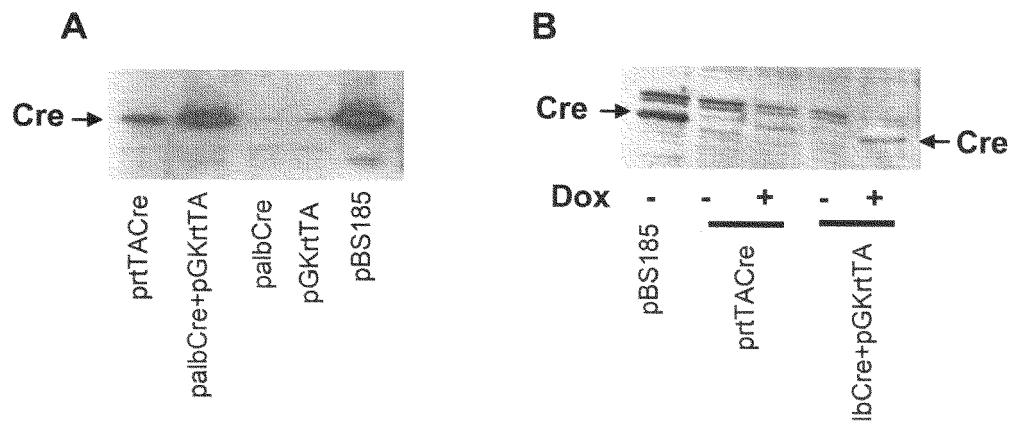


FIGURA 5

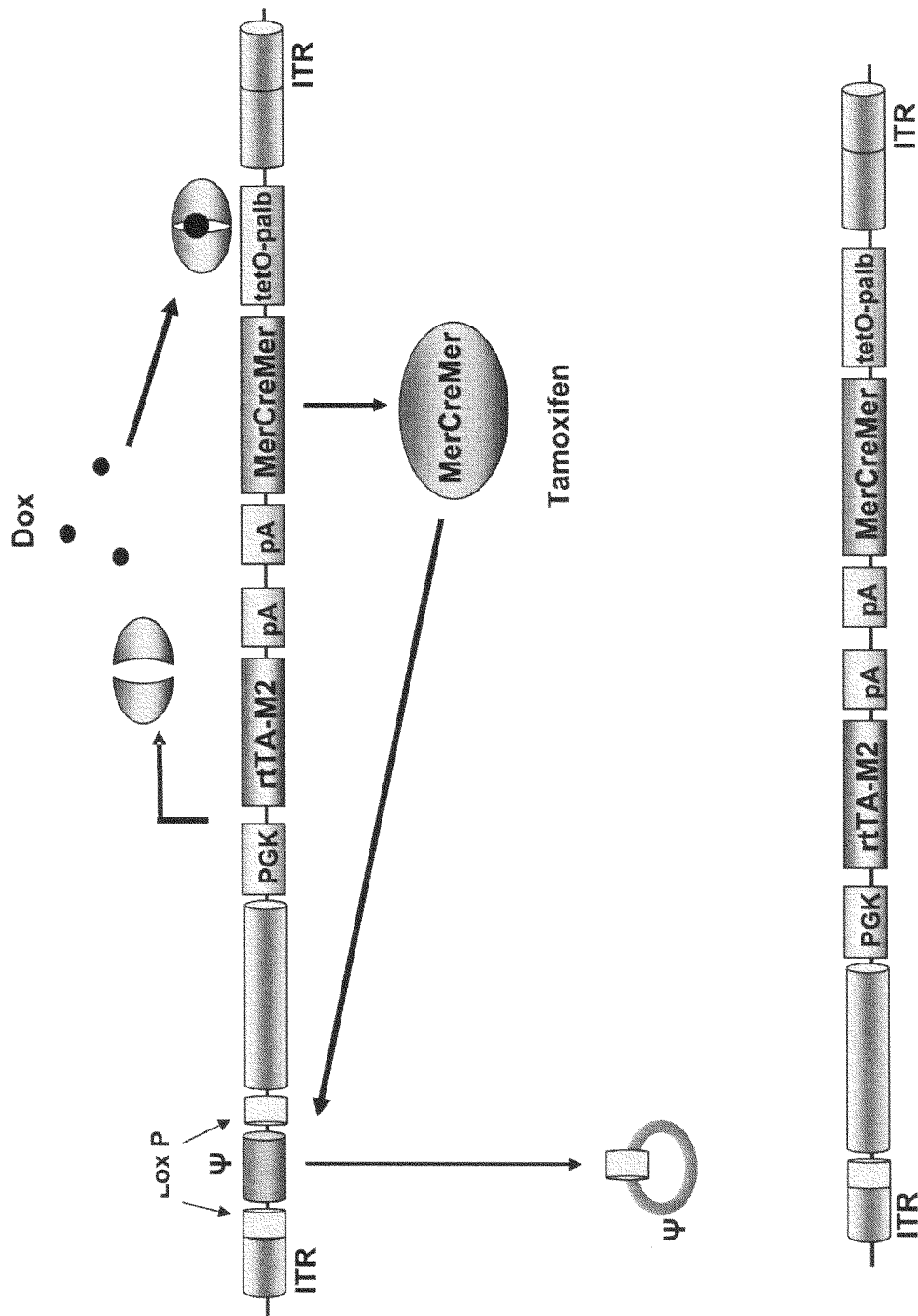


FIGURA 6

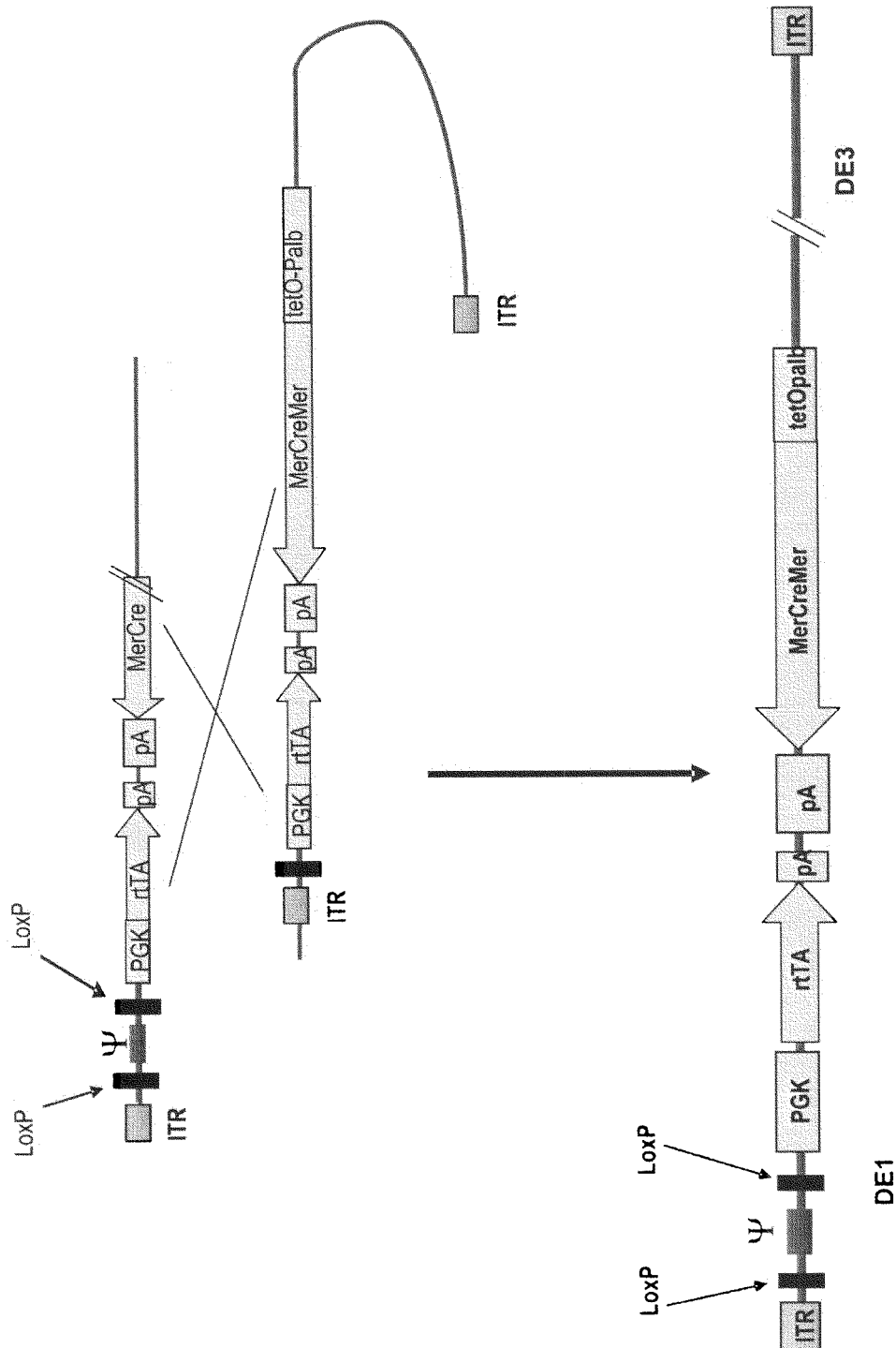


FIGURA 7

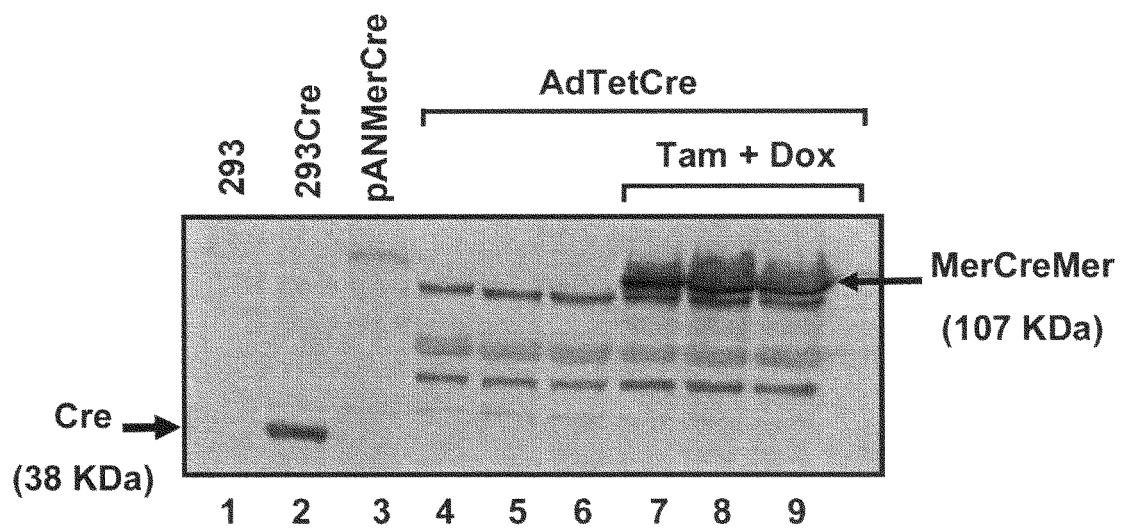


FIGURA 8

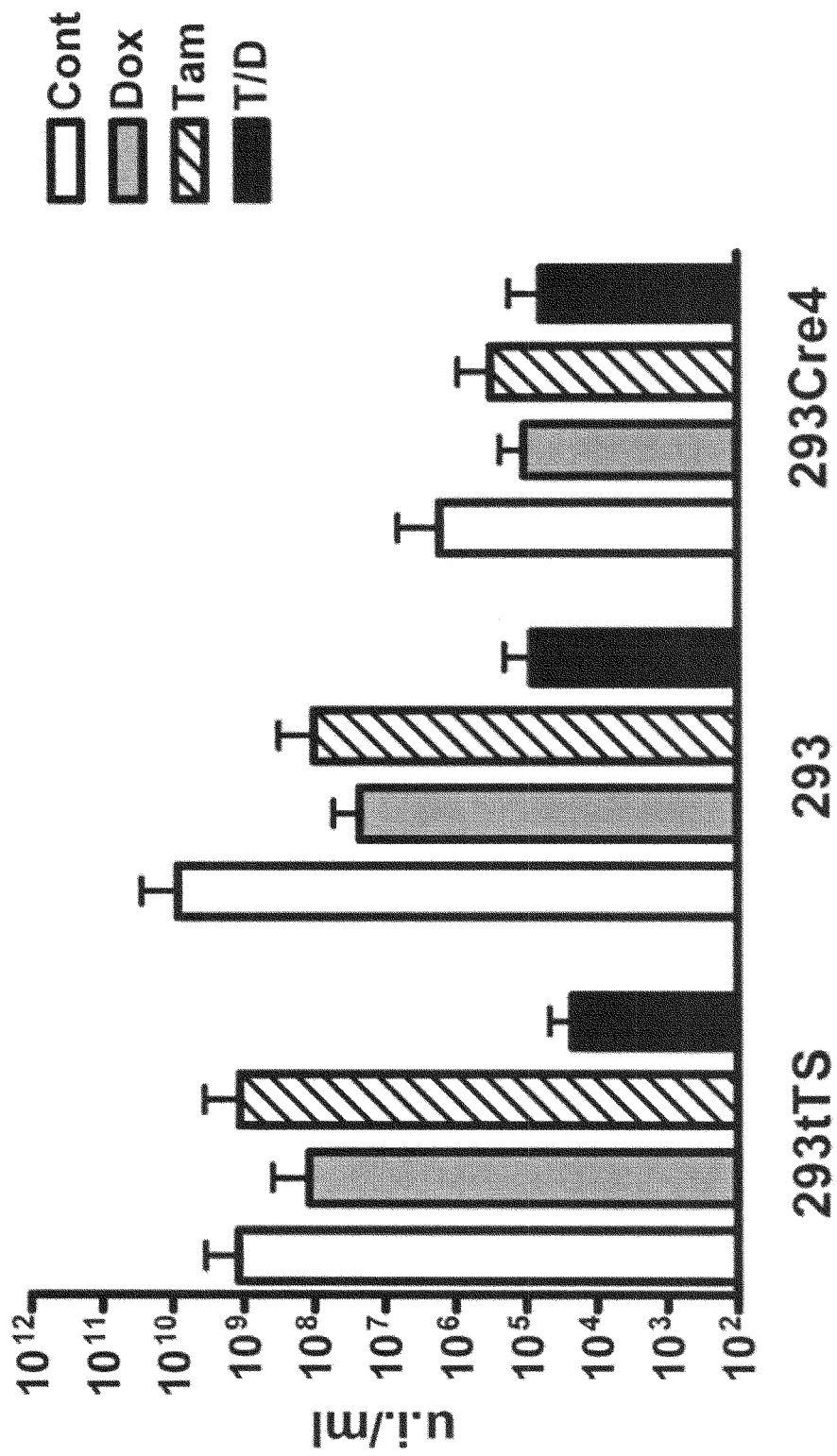


FIGURA 9

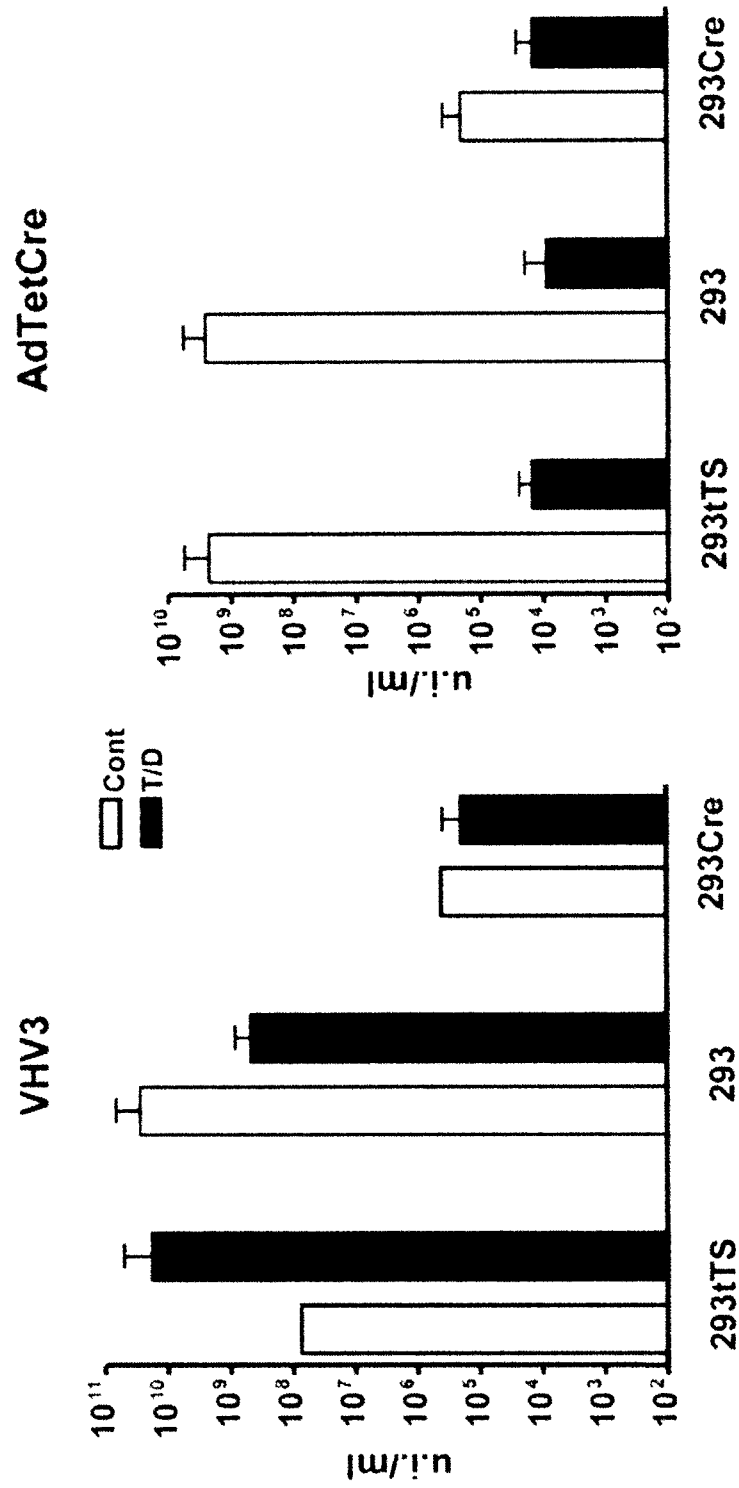


FIGURA 10

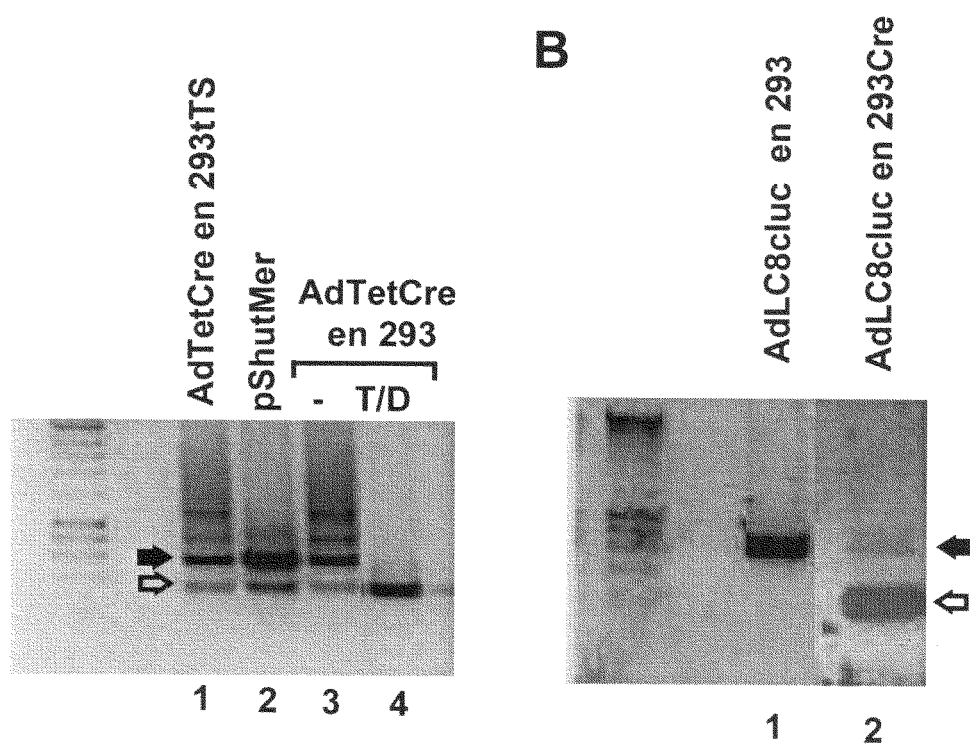


FIGURA 11

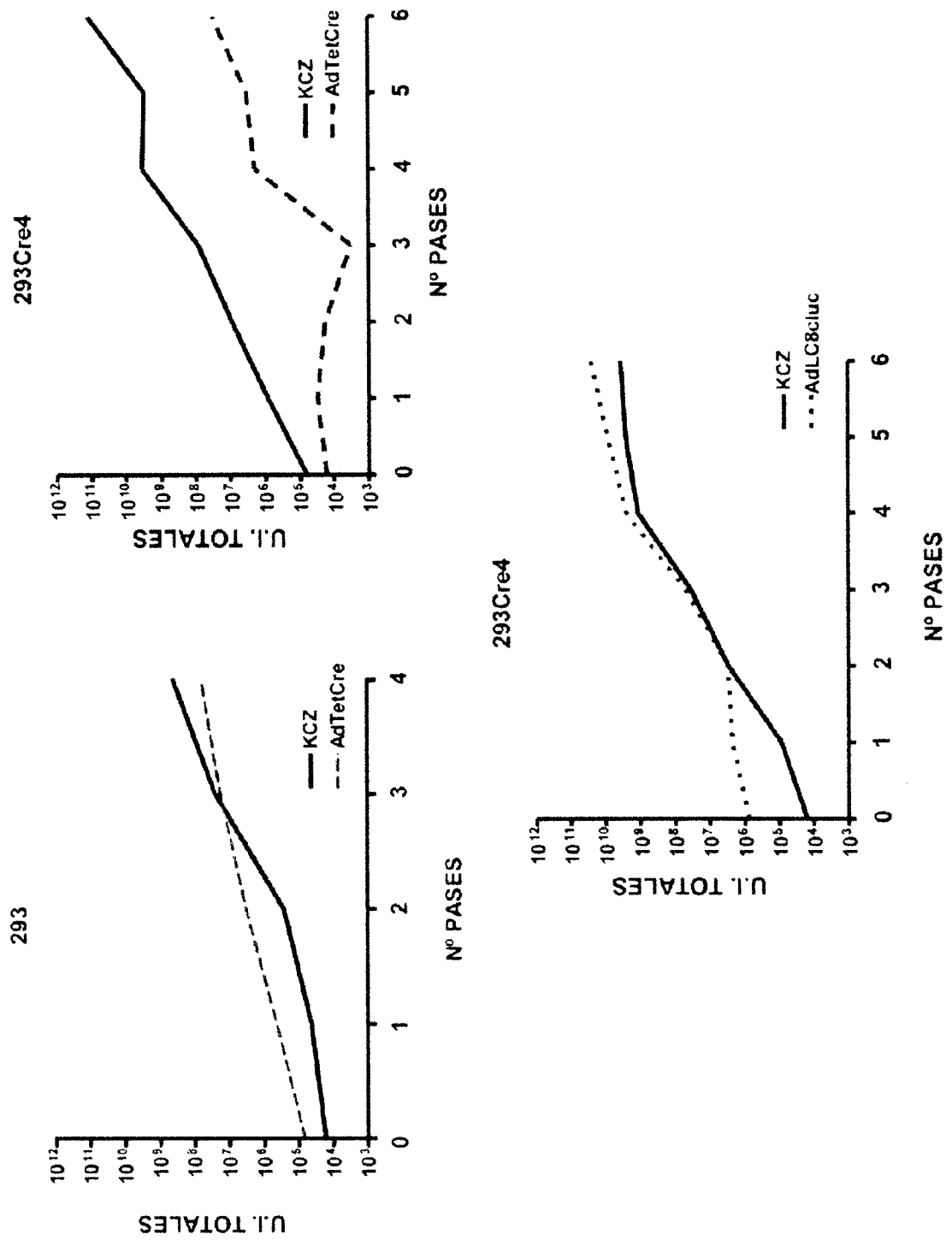


FIGURA 12

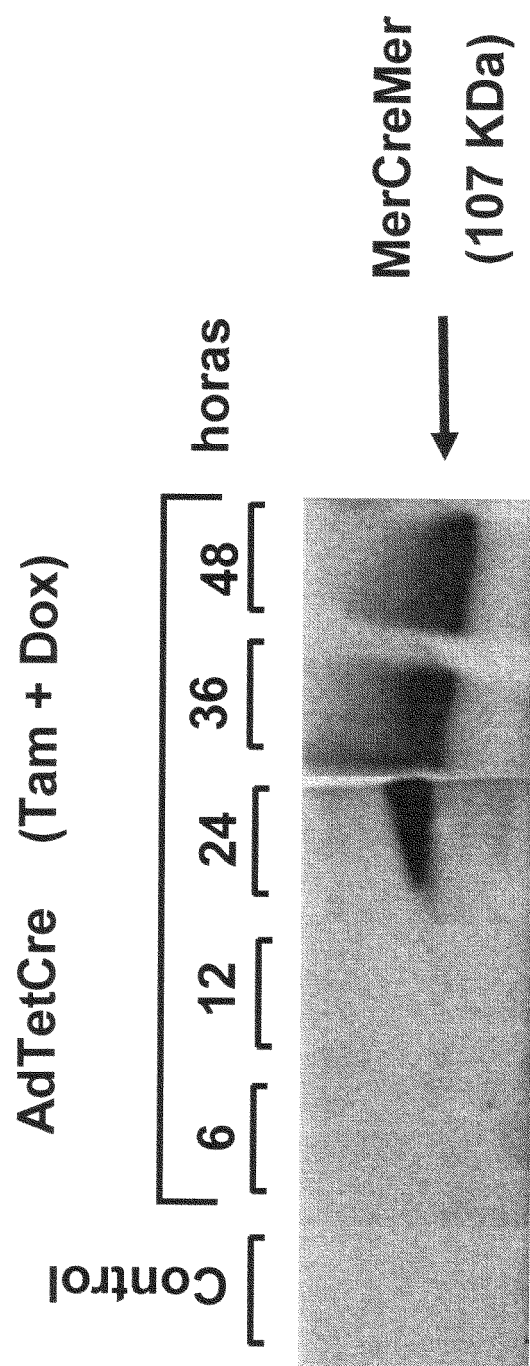


FIGURA 13

ES 2 337 973 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Proyecto de Biomedicina Cima, S.L.

5 <120> ADENOVIRUS AUXILIARES AUTO-INACTIVANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS RE-COMBINANTES DE ALTA CAPACIDAD

10 <130> P3809ES00

<160> 6

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Cebador 5Ad5St

<400> 1

30 tagtgtggcg gaagtgtgat gttg 24

<210> 2

<211> 37

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Cebador AdpTGC-10

<400> 2

45 tgactagtat aagcggccgc agcagatacg ggatatac 37

<210> 3

<211> 37

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Cebador 5SwaB

<400> 3

60 ctgactgagc ggccgcattt aatgtcgac acttcac 37

<210> 4

<211> 37

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 337 973 B2

	<220>		
	<223> Cebador 3SwaB		
5	<400> 4		
	gtgaagtgtc gacatttaaa tgcggccgct cagtcag		37
10	<210> 5		
	<211> 38		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador 5ClaITR		
20	<400> 5		
	actgacatcg atttaattaa catcatcaat aatatacc		38
25	<210> 6		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador 3ClaLoxP		
35	<400> 6		
	tagattatcg attcttaacc acgcccagat c		31
40			
45			
50			
55			
60			
65			



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 337 973

⑫ Nº de solicitud: 200801434

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 16.05.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2002072120 A1 (LUSKY MONIKA [DE] AND MEHTALI MAJID [DE]) 13.06.2002, resumen; página 3, párrafos 24-25,27-29; página 4, párrafos 41,43; página 5, párrafos 47-48,61; reivindicaciones 10,12,13,16-17.	1,2,6-11, 17-22,26, 27,30
Y	Página 4, párrafo 41.	14
Y	WO 0220814 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION [US]) 14.03.2002, página 15, líneas 25-27.	14
A	ALBA R et al. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. Gene Therapy. 2005, Vol. 12, páginas 18-27. Especialmente, resumen; páginas 20-21.	1-30
A	ALBA R et al. Differential amplification of adenovirus vectors by flanking the packaging signal with attB/attP-fiC31 sequences: Implications for helper-dependent adenovirus production. Virology. 2007, Vol 367, páginas 51-58. Especialmente, resumen; páginas 52,56.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.04.2010

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/5

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

C12N

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

EPODOC, WPI, USPTO PATENT DATABASE, INVENES, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, SCIENCEDIRECT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.04.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3-5, 12-16, 23-25, 28, 29	SÍ
	Reivindicaciones	1, 2, 6-11, 17-22, 26, 27, 30	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3-5, 12, 13, 15, 16, 23-25, 28, 29	SÍ
	Reivindicaciones	1, 2, 6-11, 14, 17-22, 26, 27, 30	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2002072120 A1	13-06-2002
D02	WO 0220814 A1	14-03-2002
D03	ALBA R et al. Gene Therapy. 2005, Vol. 12, páginas 18-27.	2005
D04	ALBA R et al. Virology. 2007, Vol 367, páginas 51-58.	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga unos adenovirus auxiliares auto-inactivantes que permiten la producción de adenovirus recombinantes de alta capacidad "gutless" en células, minimizando el grado de contaminación con adenovirus auxiliares. Los adenovirus auxiliares presentan un genoma que comprende una región que codifica para una recombinasa específica de sitio bajo control de un promotor inducible. Asimismo, contienen otra región esencial para la replicación y/o empaquetamiento del genoma adenoviral flanqueada por secuencias de reconocimiento específicas de la recombinasa codificada por la secuencia anterior, que actúa eliminando la señal de replicación o empaquetamiento para evitar la generación de partículas de adenovirus auxiliares. Adicionalmente, el vector auxiliar comprende una secuencia que codifica un transactivador del promotor de la recombinasa, dependiente de un análogo de tetraciclina. Por su parte, la recombinasa puede ser una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a hormonas como estrógenos que regulan su función (reivindicaciones 1-10). Se refiere también, a un sistema para la replicación y empaquetamiento de un adenovirus auxiliar, que comprende un polinucleótido, vector o partícula adenoviral con las características anteriores y una célula eucariótica que puede expresar un represor transcripcional del promotor de la recombinasa, que es activo en ausencia del análogo de tetraciclina que activa el promotor de la recombinasa a través del transactivador mencionado. Asimismo, divulga sistemas y métodos de obtención de adenovirus recombinantes de alta capacidad que comprende los adenovirus auxiliares producidos, un adenovirus "gutless" que contiene un gen heterólogo de interés, y una célula eucariótica, la cual puede expresar la misma recombinasa específica de sitio bajo control de un promotor inducible codificada en el vector auxiliar; adicionalmente, la célula puede expresar el transactivador específico del promotor de la recombinasa (reivindicaciones 11-30).

El documento D01 divulga un sistema dependiente de adenovirus auxiliar para la generación de adenovirus recombinantes de alta capacidad en una línea celular eucariótica que permite reducir la cantidad de partículas de adenovirus auxiliar contaminante. Dicho sistema se basa en adenovirus auxiliares que comprenden una secuencia de encapsidación, cuya expresión puede estar atenuada, o flanqueada por secuencias de reconocimiento de una recombinasa específica de sitio que actúa eliminándola. Dicha recombinasa está codificada en el propio vector auxiliar, bajo control de un promotor inducible, y puede ser también expresada de forma inducible por la célula eucariótica (ver resumen; página 3, párrafos 24-25, 27-29; página 4, párrafos 41, 43; página 5, párrafos 47-48, 61; reivindicaciones 10, 13, 16-17).

El documento D02 divulga vectores adenovirales no dependientes de adenovirus auxiliares para expresión de genes heterólogos en células eucarióticas, que evitan la respuesta inmune en el hospedador derivada de la expresión de genes adenovirales. Los vectores, de ADN lineal, presentan sitios de reconocimiento específicos por una recombinasa, que se encuentra codificada en el propio genoma del vector, y que es también expresada por la célula. La acción de la recombinasa produce un episoma con capacidad autorreplicativa dentro de la célula, que contiene la secuencia heteróloga. Se refiere también a un método para la producción del vector adenoviral lineal, y una composición farmacéutica que comprende el vector (ver resumen; página 10, líneas 7-23; página 15, líneas 23-30; página 16, línea 27-página 17, línea 9; página 26, líneas 15-29; página 30, líneas 10-26; página 32, líneas 20-28; reivindicaciones 1-30).

El documento D03 divulga adenovirus recombinantes de alta capacidad (gutless) dependientes de adenovirus auxiliares, incluyendo una revisión de los distintos sistemas empleados para minimizar los títulos de partículas de adenovirus auxiliar en la producción de adenovirus recombinantes (ver resumen; páginas 20-21).

Hoja adicional

El documento D04 divulga un sistema para la producción de adenovirus gutless en el que el adenovirus auxiliar contiene en su genoma la señal de encapsidación (psi) flanqueada por secuencias attB/attP, reconocibles por la recombinasa fiC31. Dichos elementos reducen la contaminación del adenovirus recombinante con adenovirus auxiliar, debido a que determinan una cinética de encapsidación más lenta para este último (ver resumen; páginas 52, 56).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986). Reivindicaciones 1-30

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica ya que anticipa sistemas y métodos para la obtención de adenovirus recombinantes dependientes de adenovirus auxiliares. Los vectores auxiliares comprenden en su genoma una señal de encapsidación (psi) flanqueada por sitios de recombinación LoxP, reconocibles de forma específica por una recombinasa. Dicha recombinasa es la proteína de fusión de Cre, con un dominio de unión de estrógenos, que es codificada por el propio vector y que se encuentra bajo el control de un promotor inducible. Asimismo, D01 divulga el uso de células 293 que expresan una recombinasa, que es una proteína de fusión de Cre, con un dominio de unión a estrógenos bajo el control de un promotor inducible. Asimismo, el método de obtención de adenovirus recombinantes contempla la amplificación por medio de la repetición de al menos alguna de las etapas del método.

El sistema de generación del adenovirus auxiliar tal y como se reivindica en la reivindicación 11 no está divulgado en D01. Sin embargo, D01 sí anticipa la preparación del adenovirus auxiliar (D01, reivindicaciones 12, 16), la cual, de forma obvia para un experto en la materia, implicaría un sistema que comprende el vector auxiliar y una célula eucariótica.

Por el contrario, el documento D01 no anticipa la inclusión en el vector auxiliar o en la célula eucariótica de una secuencia que codifique un transactivador dependiente de doxiciclina que regule la recombinasa; ni la expresión, por parte de la célula, de un represor dependiente de doxiciclina que evite la expresión residual de la recombinasa en la etapa de producción del adenovirus auxiliar. Tampoco anticipa el uso de la proteína de fusión MerCreMer activable por tamoxifeno como recombinasa.

En consecuencia, el objeto de la invención tal y como se reivindica en las reivindicaciones 1-2, 6-11, 17-22, 26-27, 30 se encuentra anticipado de forma idéntica en el documento D01. Por lo tanto, dichas reivindicaciones carecen de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

Sin embargo, las reivindicaciones 3-5, 12-16, 23-25, 28-29 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1 Reivindicaciones 3-5, 12-16, 23-25, 28-29

La diferencia entre D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud se encuentra en la inclusión, en la presente invención, de un transactivador del promotor de la recombinasa codificado por el vector auxiliar y/o la célula, y que es dependiente de un análogo de tetraciclina. La inclusión del transactivador en el vector auxiliar aporta, de acuerdo con la descripción, la ventaja de poder adaptar la cantidad de transactivador al número de copias de genoma adenoviral auxiliar en la célula. Adicionalmente, la célula hospedadora en la que se producen los adenovirus auxiliares de la invención expresa un represor de la expresión de la recombinasa, activo en ausencia del análogo de tetraciclina que activa el transactivador, lo cual implica una mejora de rendimiento en la producción de adenovirus auxiliares.

Otra diferencia entre D01 y la presente solicitud estriba en la recombinasa empleada en la invención, MerCreMer, la cual introduce la ventaja técnica de que la recombinasa sea controlada por tamoxifeno sin afectar la posible respuesta de la célula empaquetadora a los estrógenos.

En cuanto al método de obtención del adenovirus auxiliar reivindicado en la reivindicación 14, el documento D01 no anticipa el mantenimiento de condiciones que impidan la expresión de la recombinasa específica de sitio y permitan la encapsidación del adenovirus auxiliar. Sin embargo, este elemento resulta obvio para un experto en la materia, y además se encuentra expresamente recogido en el documento D02 (página 15, líneas 25-27).

De acuerdo con lo expuesto, las reivindicaciones 3, 4, 5, 12, 13, 15, 16, 23, 24, 25, 28 y 29 cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

Por el contrario, se considera que la reivindicación 14 carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D03 y D04, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.