



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 354 188**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07867164 .1**

96 Fecha de presentación : **28.09.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2073849**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **Procedimiento y composiciones para terapia génica.**

30 Prioridad: **29.09.2006 US 848614 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.03.2011

73 Titular/es: **CANJI, Inc.**
901 California Avenue
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es: **Laface, Drake M. y**
Tsai, Van T.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

REFERENCIA A SOLICITUDES DE PATENTE RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad según 35 USC 119 (e) del número de serie de solicitud provisional de EE.UU. 60/848.614 presentada el 29 de septiembre de 2006, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

10

La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para terapia génica, en particular terapia génica usando adenovirus PEGilados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Los efectos adversos dependientes de la dosis se han asociado con la administración sistémica de adenovirus recombinantes para terapia génica. Como ocurre con otros tipos de terapias, con la terapia génica basada en adenovirus se desea mitigar los efectos adversos al mismo tiempo que se maximiza la eficacia terapéutica.

20

RESUMEN DE LA INVENCION

25

La presente invención proporciona un procedimiento de mitigar efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

30

La presente invención proporciona un procedimiento de mitigar efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

35

La presente invención también proporciona un procedimiento de mitigar efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de

adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de mitigar efectos cardiovasculares asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un
5 sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención también proporciona un procedimiento de mitigar efectos cardiovasculares asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un
10 sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de mitigar la coagulopatía asociada con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de
15 adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención también proporciona un procedimiento de mitigar la coagulopatía asociada con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un
20 sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de mitigar respuestas anafilactoides asociadas con la administración sistémica de un vector adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un
30 sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención también proporciona un procedimiento de mitigar las respuestas anafilactoides asociadas con la administración sistémica de un vector
35

adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización más, la invención proporciona un procedimiento de mitigar los efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión, y en el que la eficiencia de la transducción del adenovirus recombinante PEGilado es igual o superior a la eficiencia de la transducción de un adenovirus recombinante no PEGilado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona adenovirus recombinante PEGilado con un grado de PEGilación que mitiga los efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante. Sin quedar ligado a teoría alguna, se cree que la PEGilación de las proteínas de la cápside adenoviral inhibe la unión de los receptores celulares capaces de inducir la liberación de mediadores inflamatorios inmediatos tales como histaminas y citocinas mediante hidrancia esteárica de las proteínas adenovirales con el(los) respectivo(s) receptor(es). También se cree que la PEGilación puede inhibir las interacciones con componentes de la sangre capaces de inducir coagulopatías diseminadas inducidas por vectores adenovirales recombinantes en un sujeto.

La presente invención proporciona un procedimiento de mitigar efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento de mitigar efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y

aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la presente invención también proporciona un procedimiento de mitigar efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de mitigar efectos cardiovasculares asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En una forma de realización, la invención también proporciona un procedimiento de mitigar efectos cardiovasculares asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de mitigar la coagulopatía asociada con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización más, la invención también proporciona un procedimiento de mitigar la coagulopatía asociada con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de mitigar

respuestas anafilactoides asociadas con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, incluidos, entre otros, sujetos predispuestos a afecciones inflamatorias y/o que presentan afecciones inflamatorias, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización, la invención también proporciona un procedimiento de mitigar las respuestas anafilactoides asociadas con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, incluidos, entre otros, sujetos predispuestos a afecciones inflamatorias y/o que presentan afecciones inflamatorias, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus recombinante PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus es de aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión.

En otra forma de realización más, la invención proporciona un procedimiento de mitigar los efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que dicho procedimiento comprende administrar a un sujeto un virión de adenovirus PEGilado, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión, tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión, y en el que la eficiencia de la transducción del adenovirus recombinante PEGilado es igual o superior a la eficiencia de la transducción de un adenovirus recombinante no PEGilado. A modo de ejemplo, y no como limitación, la eficiencia de la transducción puede ser superior a la del adenovirus recombinante no PEGILADO cuando en el suero hay anticuerpos neutralizantes.

En general, la administración de más de 1250 moléculas de PEG por virión y hasta aproximadamente 1600 moléculas de PEG por virión está asociada con menor eficiencia de transducción pero superior mitigación de los efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica. Ejemplos de afecciones en un sujeto en el que la administración sistémica del adenovirus recombinante PEGilado (p. ej., un adenovirus recombinante PEGilado con replicación deficiente que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica) puede ser útil incluyen, entre otras, afecciones inflamatorias crónicas. Ejemplos de dichas afecciones incluyen, entre otros, EPOC, artritis reumatoide y cáncer.

En la técnica se conocen procedimientos de medición de la eficiencia de la transducción.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden el adenovirus PEGilado.

5

General

De acuerdo con la presente invención se pueden emplear técnicas convencionales de biología molécula, microbiología y de ADN recombinante, dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (en el presente documento "Sambrook, y col., 1989"); DNA Cloning A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)); Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986)); Immobilized Cells And Enzymes (I RL Press, (1986)); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel, y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994).

20

PEGilación de Adenovirus

El virión de adenovirus puede PEGilarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La modificación PEG es una técnica bien establecida para la modificación de los péptidos y proteínas terapéuticas. Una ventaja principal de la PEGilación de proteínas y péptidos incluye una reducción de la antigenicidad y la inmunogenicidad. La preparación de conjugados PEG-proteína requiere, en general, la activación de grupos hidroxilo de PEG con un reactivo adecuado que se puede sustituir por completo con grupos nucleofílicos (principalmente grupos de lisina ϵ .amino) en la proteína durante la reacción de acoplamiento (O'Riordan y col., Hum. Gene Ther. 10:1349-1358 (1999)). Se ha desarrollado una amplia variedad de procedimientos para producir adaptadores PEG activados (Francis y col., J. Drug Target. 3:321-340 (1996)).

30

Asimismo, se dispone de muchos procedimientos para la conjugación de varios polietilenglicoles con la proteína de la cápsida de adenovirus ((O'Riordan y col., Hum. Gene Ther. 10:1349-1358 (1999)). Croyle y col. (Hum. Gene Ther. 11:1713-1722 (2000)) describen tres procedimientos de conjugación con tiempos de reacción acortados que modifican

35

suficientemente la cápside viral y la estabilidad física del adenovirus en condiciones de almacenamiento extremas. En la técnica se dispone de otros procedimientos. A modo de ejemplo, y sin limitaciones, el polímero se puede conjugar de forma covalente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.711.944 y 5.951.974) o no covalente (véase, por ejemplo, el documento WO2005/012407)

Para la PEGilación de proteínas y rAd se dispone de varios adaptadores de polietilenglicoles activados. PEG-SPA (SPA: éster de succinimidilo de ácido propiónico PEG), que es polietilenglicol activado con N-hidroxisuccinimida (NHS) en un extremo y tapado con un grupo metoxi en el otro, se puede seleccionar para pegar el adenovirus.

También se dispone de PEG-SPA con un resto de fluoresceína en el PEG en el extremo opuesto del éster de NHS. La ventaja de este adaptador de PEG marcado con fluoresceína (en el presente documento abreviado como fluoro-PEG-SPA) es que tiene la misma reactividad que PEG-SPA. En una forma de realización preferida se usa el adaptador PEG-SPA con un peso molecular del PEG de 5 kDa.

También se pueden usar otros adaptadores de PEG. Por ejemplo, para pegar con éxito adenovirus se ha usado tresil-MPEG (TM-PEG) ((O'Riordan y col., Hum. Gene Ther. 10: 1349-1358 (1999); Sigma Chemical (St. Louis, MO); Shearwater Polymers (Huntsville, AL); PolyMASC Pharmaceuticals (Londres, Reino Unido)). Otros adaptadores comercialmente disponibles incluyen succinato de succinimidilo MPEG (SS-PEG), poliftalamida (PPA) y cloruro cianúrico MPEG (CC-PEG) (Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)).

A modo de ejemplo y sin limitaciones, en general entre aproximadamente un 1 % p/v de PEG hasta aproximadamente un 4 % p/v de PEG generarán entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión. Asimismo, a modo de ejemplo y sin limitaciones, en general entre aproximadamente un 5 % p/v de PEG hasta aproximadamente un 8 % p/v de PEG generarán más de aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1600 moléculas de PEG por virión. (Véase, por ejemplo, el documento 2007/062207)

Pegilación de adenovirus

El adenovirus puede pegarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica. A modo de ejemplo, y sin limitaciones, el polímero se puede conjugar de forma covalente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.711.944 y 5.951.974) o no covalente (véase, por ejemplo, el documento WO2005/012407). (véase el documento U.S.S.N: 60/739.739, presentada el 23 de noviembre de 2006), que se incorpora en la presente memoria descriptiva

en su totalidad por referencia). Véase también el documento U.S.S.N: 60/739.739, presentada el 23 de noviembre de 2006), que se incorpora en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia.

5 Procedimientos para determinar el grado de PEGilación

También se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para determinar el grado relativo de PEGilación del virión. En una forma de realización preferida, el procedimiento usado para determinar el grado promedio de pegilación del virión de adenovirus
10 usa ultracentrifugación analítica (AUC) en gradientes de CsCl (véase el documento U.S.S.N: 60/739.739 presentado el 23 de noviembre de 2006, ahora la publicación internacional nº WO2007/062207, que se incorpora en la presente memoria descriptiva en su totalidad por referencia). También se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica para determinar el grado relativo de PEGilación de la preparación de conjugado polímero-partícula
15 que se va a usar como patrón. Por ejemplo, el procedimiento de la técnica anterior de usar adaptador de PEG marcado con biotina cuyo DP se ha determinado mediante análisis ELISA del rAd PEGilado marcado con biotina con peroxidasa de rábano-avidina (O'Riordan y col., Hum. Gene Ther. 10: 1349-1358 (1999)) se puede usar como patrón. Como alternativa, la preparación del virus PEGilado se puede tratar con fluorescamina para cuantificar la pérdida de
20 grupos de lisina respecto a los controles no PEGilados (Croyle y col., Hum. Gene Ther. 11: 1713-1722) para la determinación del grado promedio de PEGilación de la preparación patrón.

Adenovirus recombinantes (rAd)

25 Los adenovirus recombinantes (rAd) son ampliamente usados para liberar genes en células para vacunas o terapia génica (Alemany y col. Gen. Virol. 81 (11):2605-2609 (2000); Vorberger & Hunt, Oncologist 7(1):46-59 (2002); Mizuguchi & Hayakawa, Hum. Gene Ther. 15(11): 1034-1044 (2004); Basak y col. Viral Immunol. 172: 182-96 (2004). El término “recombinante” se refiere a un genoma que se ha modificado mediante técnicas de ADN
30 recombinante convencionales.

El término “adenovirus” es sinónimo del término “vector adenoviral” y se refiere a virus del género adenoviridae. El término “adenovirus recombinante” es sinónimo del término “vector adenoviral recombinante” y se refiere a virus del género adenoviridae capaces de infectar una célula, cuyos genomas virales se han modificado a través de técnicas de ADN recombinante
35 convencionales. El término adenovirus recombinante también incluye vectores quiméricos (o

incluso multiméricos), es decir vectores contruidos usando secuencias codificadoras complementarias de más de un subtipo de virus.

El término adenoviridae se refiere, en conjunto, a adenovirus animales del género mastadenovirus, incluidos, entre otros, subgéneros de adenovirus de humano, bovino, ovino, equino, canino, porcino, murino y simio. En particular, adenovirus humanos incluyen los subgéneros de A-F, así como los serotipos individuales de los mismos. Por ejemplo, cualquiera de los tipos de adenovirus 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 7a, 7d, 8, 9, 10, 11 (Ad11A y Ad11P), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 34a, 35, 35p, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 91 se pueden producir en un cultivo celular de la invención. En la práctica preferida de la invención, el adenovirus es o deriva de los serotipos de adenovirus humano 2 ó 5.

El adenovirus recombinante es un adenovirus recombinante o un vector adenoviral recombinante, que comprende un genoma mutado; por ejemplo, el genoma mutado puede carecer de un segmento o puede incluir uno o más genes heterólogos adicionales. En una forma de realización, el vector adenoviral recombinante es el sistema de expresión del vector adenoviral, que tiene una delección del gen de la proteína IX (véase la solicitud de patente internacional WO 95/11984, que se incorpora en la presente memoria descriptiva por referencia).

En otra forma de realización, el adenovirus es un adenovirus recombinante de replicación selectiva o un adenovirus de replicación condicional, es decir un adenovirus que está atenuado en las células normales al tiempo que se mantiene la replicación vírica en las células tumorales, véase, *por ejemplo*, Kirn, D. y col., Nat. Med. 7:781-787 (2001); Alemany, R. y col. Nature Biotechnology 18: 723-727 (2000); Ramachandra, M. y col., Replicating Adenoviral Vectors for Cancer Therapy in Pharmaceutical Delivery Systems, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 321-343 (2003).

En una forma de realización de la invención, el adenovirus recombinante de replicación selectiva o el vector adenoviral es como los descritos en la solicitudes internacionales publicadas número WO 00/22136 y WO 00/22137; Ramachandra, M. y col., Nature Biotechnol 19: 1035-1041, 2001; Howe y col., Mol. Ther. 2(5): 485-95 (2000); y Demers, G. y col. Cancer Research 63: 4003-4008 (2003).

Un adenovirus de replicación selectiva también se puede describir como, entre otros, un "adenovirus de replicación oncolítica", un "vector adenoviral de replicación", un "vector adenoviral de replicación condicional" o un "CRAV". En otra forma de realización de la invención, la PEGilación se puede usar para mitigar las respuestas adversas, como se ha descrito en lo que antecede, inducidas por otros tipos de vectores virales. Ejemplos incluyen,

entre otros, vectores retrovirales, vectores virales asociados con adenovirus, vectores lenivirales y vectores del virus SV40.

En una forma de realización del adenovirus recombinante de la invención comprende una secuencia de nucleótidos heterólogos tales como, entre otros, un resto, péptido, 5 polipéptido o proteína que posee una propiedad o actividad biológica deseada.

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos heterólogos codifica un modificador de la respuesta biológica, tal como una citocina, receptor de citocina, hormona, factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento. Ejemplos no limitantes de dichos modificadores de respuesta biológica incluyen interferón (IFN)-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, 10 interleucina (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento ácido de fibroblastos (aFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), linfopoyetina estromal tímica (TSLP), GM-CSF, TNFR y miembros de la superfamilia del ligando 15 del TNFR TNFRSF 18 y TNFSF18. En una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos codifica un interferón, tal como interferón alfa 2b. (véase, p. ej., la patente de EE.UU. Nº 6.835.557, incorporada en la presente memoria descriptiva por referencia en su totalidad).

En otras formas de realización, la secuencia de nucleótidos heterólogos codifica un anticuerpo. En otras formas de realización más, la secuencia de nucleótidos heterólogos 20 codifica una proteína quimérica o de fusión.

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos heterólogos codifica una proteína antigénica, un polipéptido o péptido de un virus perteneciente a una especie diferente, subgrupo o variante de un adenovirus de otra especie, subgrupo o variante del que deriva el 25 vector de adenovirus recombinante. En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos heterólogos codifica una proteína, un polipéptido o péptido antigénico obtenidos y/o derivados de un microorganismo patógeno.

En otra forma de realización más de la invención, la secuencia de nucleótidos heterólogos es un gen terapéutico del cáncer. Dichos genes incluyen los que potencian la 30 actividad antitumoral de linfocitos, genes cuyo producto de expresión potencia la inmunogenicidad de las células tumorales, genes supresores de tumores, genes de toxinas, genes suicidas, genes de resistencia a múltiples fármacos, secuencias antisentido y similares. Por tanto, por ejemplo, el vector adenoviral de la presente invención puede contener un gen extraño para la expresión de una proteína eficaz en la regulación del ciclo celular, tal como p53, 35 Rb o mitosina, o en la inducción de la muerte celular, tal como el gen suicida condicional de la

timidina cinasa.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “célula de producción de rAd”, “célula productora” y “célula empaquetadora” son sinónimos y quieren decir una célula capaz de propagar adenovirus recombinantes suministrando un producto requerido para un crecimiento viral eficiente. Públicamente se dispone de varias líneas de células de mamífero para el cultivo de adenovirus recombinantes. Por ejemplo, la línea celular 293 (Graham & Smiley, J. Gen Virol. 36: 59-72 (1977)) se ha sometido a ingeniería para complementar las deficiencias de la función de E1.

Las células o líneas celulares de producción de rAd se pueden propagar usando técnicas estándar de cultivo celular (véase, p. ej., R. I. Freshney, Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Techniques, Segunda Edición, Wiley-Liss, Inc. New York, N.Y., 1987).

Las células pueden crecer en condiciones que contienen suero o sin suero. El cultivo en suspensión se puede sacudir, balancear, rodar, agitar o remover para mantener las células en suspensión.

“A549” es una línea celular de carcinoma de pulmón conocida habitualmente en la técnica. En una forma de realización, la célula A549 es la cepa de la ATCC CCL-185.

Las células de producción de adenovirus recombinante o la línea celular de producción se pueden propagar o cultivar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para cultivo de células de mamífero. La propagación se puede realizar mediante un procedimiento de una sola etapa o de múltiples etapas. Por ejemplo, en un procedimiento de propagación de una sola etapa, las células de producción se extraen de su almacenamiento y se inoculan directamente en un vaso de cultivo en el que va a tener lugar la producción de virus. En un procedimiento de propagación de múltiples etapas, las células de producción se extraen de su almacenamiento y se propagan a través de una serie de vasos de cultivo de tamaño gradualmente mayor hasta que alcanzan el vaso de cultivo final en el que va a tener lugar la producción. Durante las etapas de propagación, las células se cultivan en condiciones optimizadas para el crecimiento. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH, el nivel de oxígeno disuelto y similares, son las que se sabe que son óptimas para la línea celular concreta y serán evidentes para el experto en la técnica en este campo (véase, p. ej., Animal Cell culture: A Practical Approach 2ª edición, Rickwood, D. y Hames, B.D. eds., Oxford University Press, New York (1992)).

Las células de producción de rAd o las líneas celulares de producción de rAd se pueden cultivar y las células de producción de rAd o las células de producción de rAd que producen virus se pueden cultivar en cualquier vaso adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar y las células infectadas se pueden cultivar en un biogenerador o un

bioreactor. En general, “biogenerador” o “bioreactor” significa un tanque de cultivo, generalmente fabricado de acero inoxidable o de cristal, con un volumen de 0,5 litros o más, que comprende un sistema de agitación, un dispositivo para inyectar una corriente de gas CO₂ y un dispositivo de oxigenación. Normalmente está equipado con sondas que miden los parámetros internos del biogenerador, tal como el pH, el oxígeno disuelto, la temperatura, la presión del tanque o ciertos parámetros fisicoquímicos del cultivo (por ejemplo, el consumo de glucosa o de glutamina, o la producción de lactato y de iones amonio). Las sondas de pH, oxígeno y temperatura están conectadas a un bioprocesador que regula de forma permanente estos parámetros. En otra forma de realización, el vaso es un bioreactor WAVE (WAVE Biotech, Bridgewater, NJ, EE.UU.).

La densidad celular en el cultivo se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la densidad celular se puede determinar microscópicamente (p. ej., con hematocitómetro) o mediante un dispositivo de recuento celular electrónico (p. ej., CONTADOR COULTER; AccuSizer 780/SPOS Single Particle Optical Sizer).

El término “que infecta” significa exponer los adenovirus recombinantes a las células o líneas celulares en condiciones tales que facilitan la infección de la célula con el adenovirus recombinante. En células que han sido infectadas por múltiples copias de un virus dado, las actividades necesarias para la replicación del virus y el empaquetamiento de los viriones son colaboradoras. Por tanto, se prefiere ajustar las condiciones de modo que existe una probabilidad significativa de que las células se infecten de forma múltiple con los virus. Un ejemplo de una condición que potencia la producción del virus en la célula es un incremento de la concentración de virus en la fase de infección. No obstante, es posible que se pueda exagerar el número total de infecciones virales por célula. En consecuencia, se debe luchar para mantener las infecciones en la concentración del virus en el intervalo de 10⁶ a 10¹⁰, preferentemente de aproximadamente 10⁹, viriones por ml. También se pueden emplear agentes químicos para aumentar la infectividad de la línea celular. Por ejemplo, la presente invención proporciona un procedimiento para incrementar la infectividad de líneas celulares para infectividad viral mediante la inclusión de un inhibidor de calpaína. Ejemplos de inhibidores de calpaína útiles en la práctica de la presente invención incluyen el inhibidor de calpaína I (también conocido como N-acetil-leucil-leucil-norleucinal, disponible comercialmente en Boehringer Mannheim). Se ha observado que el inhibidor de calpaína I incrementa la infectividad de las líneas celulares en adenovirus recombinantes.

El término “cultivar en condiciones que permitan la replicación del genoma viral” significa mantener las condiciones de la célula infectada de modo que permita que el virus se propague en la célula. Es deseable controlar las condiciones de modo que se maximice el

número de partículas virales producidas por cada célula. En consecuencia, será necesario monitorizar y controlar las condiciones de la reacción, tales como, por ejemplo, la temperatura, el oxígeno disuelto y el nivel de pH. Los bioreactores disponibles comercialmente, tales como CelliGen Plus Bioreactor (disponible comercialmente en New Brunswick Scientific, Inc. 44 Talmadge Road, Edison, NJ) tienen equipamiento para monitorizar y mantener dichos parámetros. La optimización de las condiciones de infección y cultivo variarán algo, no obstante expertos en la técnica pueden alcanzar las condiciones para la replicación y producción eficiente del virus, teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la línea celular productora, las propiedades del virus y el tipo de bioreactor.

En las células se pueden producir virus, tales como adenovirus. Los virus se pueden producir cultivando las células; añadiendo opcionalmente a las células medio de crecimiento fresco; inoculando las células con el virus; incubando las células inoculadas (para cualquier periodo de tiempo); añadiendo opcionalmente a las células inoculadas medio de crecimiento fresco; y recogiendo opcionalmente el virus de las células y del medio. Normalmente, cuando la concentración de las partículas virales, determinada mediante procedimientos convencionales, tales como cromatografía de líquidos de alto rendimiento usando una columna Resource, como se ha descrito en Shabram, y col. Human Gene Therapy 8: 453-465 (1997), comienza a llegar a una meseta, se realice la recolección.

El medio de crecimiento fresco se puede proporcionar a las células inoculadas en cualquier momento. Por ejemplo, el medio fresco se puede añadir mediante perfusión. El intercambio de medios puede incrementar significativamente la producción de virus en las células. En una forma de realización de la invención, el medio de las células se somete a dos intercambios consecutivos, uno tras la infección y otro un día después de la infección.

Las células usadas para producir el virus pueden derivar de una línea celular congelada en condiciones de medio sin suero o de una línea celular congelada en condiciones de medio con suero (p. ej., de un banco de células congeladas).

Procedimientos adecuados para identificar la presencia del virus en el cultivo, es decir demostrando la presencia de proteínas virales en el cultivo, incluyen pruebas de inmunofluorescencia, que pueden usar un anticuerpo monoclonal contra una de las proteínas virales o anticuerpos policlonales (Von Bulow y col., en Diseases of Poultry, 10ª edición, Iowa State University Press), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o PCR anidada (Soiné y col., Avian Diseases 37: 467-476 (1993)), ELISA (Von Bülow y col., en Diseases of Poultry, 10ª edición, Iowa State University Press)), expresión de hexones analizadas mediante citometría de flujo (Musco y col. Cytometry 33:290-296 (1998)), neutralización de virus o cualquiera de los procedimientos histoquímicos habituales de identificación de proteínas virales específicas.

La titulación de la cantidad de adenovirus en el cultivo se puede realizar mediante técnicas conocidas en la técnica. En una forma de realización concreta, la concentración de partículas virales se determina mediante el ensayo Resource Q tal como describen Shabram, y col. Human Gene Therapy 8: 453-465 (1997). Como se usa en la presente memoria, el término “lisis” se refiere a la rotura de las células que contienen virus. La lisis se puede conseguir mediante una variedad de medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células de mamífero se pueden lisar en condiciones de presión baja (0,70-1,4 MPa de presión diferencia), mediante homogeneización, mediante microfluidificación o mediante procedimientos de congelación-descongelación convencionales. El ADN/ARN libre exógeno se puede retirar mediante degradación con ADNasa/ARNasa.

Las células que contienen adenovirus se pueden congelar. Los adenovirus se pueden recolectar de las células que contienen virus y del medio. En una forma de realización, los adenovirus se recolectan a partir de las células que contienen virus y del medio de forma simultánea. En una forma de realización concreta, las células productoras de adenovirus y el medio se someten a microfiltración de flujo cruzado, tal como se ha descrito en, por ejemplo, la patente de EE.UU. número 6.146.891, en condiciones que, de forma simultánea, lisen las células que contienen virus y aclaren el medio de residuos celulares que, de otro modo, interferirían con la purificación de virus.

El término “que recolecta” quiere decir la recolección de las células que contienen el adenovirus del medio y puede incluir recolección del adenovirus del medio. Esto se puede conseguir mediante procedimientos convencionales tales como centrifugación diferencial o medios cromatográficos. En esta etapa, las células recolectadas se pueden almacenar congeladas o procesar adicionalmente mediante lisis y purificación para aislar el virus. El ADN/ARN libre exógeno se puede retirar mediante degradación con ADNasa/ARNasa, tal como BENZONASE (American International Chemicals, Inc.).

La recolección de virus se puede procesar adicionalmente para concentrar el virus mediante procedimientos tales como ultrafiltración o filtración de flujo tangencial tal como se ha descrito en las patentes de EE.UU. números 6.146.891 y 6.544.769.

El término “que recupera” quiere decir el aislamiento de una población sustancialmente pura de partículas de virus recombinantes a partir de células productoras lisadas y, opcionalmente, del medio sobrenadante. Las partículas virales producidas en los cultivos celulares de la presente invención se pueden aislar y purificar mediante cualquier procedimiento que sea conocido normalmente en la técnica. Se pueden emplear técnicas de purificación convencionales tales como procedimientos cromatográficos o de centrifugación diferencial por gradiente de densidad. Por ejemplo, las partículas virales se pueden purificar

mediante purificación en gradiente de cloruro de cesio, cromatografía en columna o discontinua, cromatografía de dietilaminoetilo (DEAE) (Haruna y col. *Virology* 13: 264-267 (1961); Klemperer y col., *Virology* 9: 536-545 (1959); Philipson y col., *Virology* 10: 459-465 (1960)), cromatográfica de hidroxipatita (publicación de solicitud de patente de EE.UU. número US2002/0064860) y cromatográfica usando otras resinas tales como polisacáridas reticulados homogéneos, que incluyen geles blandos (p. ej., agarosa), polímeros microporosos "canales", sorbentes "tentaculares", que tienen tentáculos que se diseñaron para interacciones más rápidas con proteínas (p. ej., fractogel) y materiales basados en un gel blando en una cubierta rígida, que explotan la elevada capacidad de geles blandos y la rigidez de los materiales compuestos (p. ej. Ceramic HyperD[®] F) (Boschetti, *Chromatogr.* 658:207 (1994); Rodriguez, J. *Chromatogr.* 699:47-61 (1997)). En la práctica preferida de la invención, el virus se purifica mediante cromatografía en columna de acuerdo sustancial con el procedimiento de Huyghe y col., *Human Gene Therapy* 6:1403-1416 (1995) tal como se ha descrito en Shabram y col., patente de EE.UU. 5.837.520 emitida el 17 de noviembre de 1998 y la patente de EE.UU. 6.261.823.

EJEMPLOS

Siguiendo en general los protocolos descritos en *Molecular Therapy*, 2005 Aug;12(2):254-63; los autores han evaluado la respuesta cardiovascular en ratones a los que se administró adenovirus recombinante pegilado o no pegilado. Se evaluó el ECG y la frecuencia cardíaca. El adenovirus recombinante se pegiló con el adaptador SPA-PEG5K. Los resultados se basan en una n de 4 y 5 en los diversos experimentos.

Se observó que la PEGilación de vectores-rAd inhibía las respuestas hemodinámicas en la mitad de los ratones tratados en tres experimentos distintos. La inhibición de las respuestas cardiovasculares hemodinámicas en ratones normales se pudo conseguir usando vectores rAd con aproximadamente 60-800 moléculas de PEG por virión.

Los efectos de la PEGilación sobre la transducción sistémica *in vivo* se evaluaron en ratones en los que se infundió por vía intravenosa 1×10^{11} partículas del vector rAd PEGILADO o no modificado 3 días después. La biodistribución se evaluó mediante PCR cuantitativa en tiempo real y RT-PCR en tejidos de hígado, bazo, glándula suprarrenal, pulmón, intestino delgado y grueso, riñón y cardíaco, para evaluar la capacidad de transducción relativa de las diversas formas. Sorprendentemente, la eficacia de la transducción en los diversos órganos fue relativamente equivalente para los vectores no modificados y rAd-PEG. La biodistribución del ADN específico transgénico fue esencialmente equivalente en todos los órganos investigados y se comparó con la expresión génica de GAPDH doméstico. Estos resultados indicaron que la

eficacia de la transducción era similar al vector rAd no PEGilado usando rAd-PEG con 600-800 moléculas de PEG/virión.

5 También se analizó la capacidad de la pegilación del vector-rAd para mitigar los acontecimientos adversos en un modelo de respuestas anafilactoides. Este modelo proporcionó a los autores la capacidad para examinar los vectores rAd-PED con varios grados de PEGilación sobre la superficie tuvo como resultado la mitigación de las respuestas anafilactoides y para correlacionar el grado de PEGilación (es decir, el número de moléculas PEG unidas covalentemente por partícula de virión) requerido para inhibir las respuestas exacerbadas asociadas con la inflamación crónica. La PEGilación de los rAd-vectores con más
10 de 1250 moléculas de PEG y hasta 1600 moléculas de PEG por virión (8 % de SPA-PEG durante la reacción de PEGilación) tuvo como resultado la inhibición de las respuestas anafilactoides.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un virión de adenovirus recombinante PEGilado **en la preparación de un medicamento** para mitigar los efectos adversos asociados con la administración sistémica de un adenovirus recombinante para terapia génica, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 400 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1250 moléculas de PEG por virión y el efecto adverso es un efecto adverso cardiovascular, una respuesta anafilactoide, coagulopatía o inflamación.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el efecto adverso es un efecto adverso cardiovascular.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que el efecto adverso es una respuesta anafilactoide.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que el efecto adverso es una coagulopatía.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que el efecto adverso es inflamación.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que la eficiencia de la transducción del adenovirus recombinante PEGilado es igual o superior a una eficiencia de la transducción de un adenovirus recombinante no PEGilado.
7. El uso de la reivindicación 1, en el que el adaptador PEG es un adaptador PEG-SPA con un peso molecular de PEG de 5 kDa.
8. El uso de la reivindicación 1, en el que el grado de PEGilación del virión del adenovirus está entre aproximadamente 600 moléculas de PEG por virión y aproximadamente 1000 moléculas de PEG por virión.