

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 628**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/761 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2020 PCT/NL2020/050443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2021 WO21006730**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2020 E 20740097 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3997106**

54 Título: **Adenovirus oncolíticos no humanos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.07.2019 NL 2023464

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

16.05.2025

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (H.O.D.N.
LUMC) (100.00%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**HOEBEN, ROB CORNELIS;
BOTS, SELAS y
KEMP, VERA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 018 628 T3

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

DESCRIPCIÓN

Adenovirus oncolíticos no humanos y usos de los mismos

La presente invención proporciona nuevas secuencias de ácidos nucleicos, vectores, adenovirus, genotipos, genomas y composiciones para su uso en terapia, particularmente para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

Antecedentes

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de mortalidad y, como tal, necesita tratamientos más eficaces y precisos. Los avances tecnológicos en modificación genética han dado lugar a un renovado interés en el uso de virus y vectores derivados de virus en la viroterapia oncolítica. Se está considerando una amplia variedad de virus para su uso como agentes oncolíticos. Entre estos, los adenovirus humanos se usan con regularidad y tienen muchas características que hacen que su uso sea muy atractivo. Entre ellas se incluyen su estrecho espectro de hospedadores, su eficiente replicación en células humanas, su aceptable perfil de seguridad, su robusta tecnología para generar variantes genéticamente modificadas, la disponibilidad de sistemas de producción eficientes y escalables y su perfil de seguridad tras su administración.

Su perfil de seguridad está respaldado por las observaciones de que una gran fracción de la población humana ha estado expuesta a adenovirus humanos, como lo demuestra la presencia de inmunidad humoral (es decir, la presencia de anticuerpos circulantes). Los adenovirus tienen una alta prevalencia con una seroprevalencia de hasta el 99 % y, como consecuencia, la mayoría de las personas han adquirido inmunidad a estos virus (Bauer et al., 2005; Vogels et al., 2003). La inmunidad suele ser específica del serotipo y la prevalencia varía con cada uno de los serotipos.

En individuos inmunocompetentes, la infección por adenovirus en la mayoría de los casos es autolimitada y se manifiesta con síntomas leves similares a los de la gripe (Lion, 2014). En pacientes con una función inmunitaria comprometida las consecuencias pueden ser más graves. Además, algunos serotipos se asocian con conjuntivitis y ocasionalmente los brotes de adenovirus oculares pueden manifestarse como queratoconjuntivitis epidémica.

Los virus oncolíticos (OV) son virus que se replican preferentemente en células transformadas y las lisan. Estos virus infectan naturalmente las células cancerosas o están modificados genéticamente para restringir su replicación a las células tumorales (Larson et al., 2015). Los virus oncolíticos median la muerte de tumores no solo a través de la lisis inducida por el virus de la célula objetivo, sino más bien a través de la liberación de antígenos específicos del cáncer y la posterior activación del sistema inmunitario (Fillee & Dey, 2017; Kaufman, Kohlhapp, & Zloza, 2015). La importancia de esto último ha sido apoyada por modelos de ratón donde se demostró que la administración intratumoral de virus oncolíticos puede afectar tumores secundarios distantes, así como prevenir la formación de tumores en experimentos de reexposición (Grekova, et al., 2012; Grossardt et al., 2013; Kleijn et al., 2014). Además, la combinación de virus oncolíticos con fármacos inmunomoduladores tiene efectos sinérgicos superiores y ocasionalmente superiores en comparación con cualquiera de las terapias por separado (Cervera- Carrascon et al., 2018; Engeland et al., 2014; Mostafa et al., 2018). En conjunto, estos resultados ilustran que la terapia con virus oncolíticos puede conducir al establecimiento de una memoria inmunitaria contra el tumor que podría apuntar tanto al tumor primario como a las metástasis. Parece que los virus oncolíticos tienen un potencial diferente según el tipo de tumor y la heterogeneidad, y el microambiente del tumor (revisado por Raja et al., 2018). De hecho, un estudio reciente que comparó cinco virus oncolíticos diferentes dentro de un modelo tumoral demostró claras discrepancias entre los virus en su potencial de oncolisis y la inducción de una respuesta inmunitaria contra el tumor (Martin et al., 2019).

El primer agente oncolítico derivado de adenovirus modificado genéticamente aprobado en el mundo ha sido un adenovirus humano que alberga una delección del gen E1 B55 kDa (Heise et al., 1997). Se están evaluando más adenovirus y podrían alcanzar la aprobación pronto.

Los adenovirus humanos se clasifican en el género mastadenovirus de Adenoviridae, que comprende varios géneros, cada uno con una gama de hospedadores bien definida y a menudo estrecha. A pesar de la estrecha gama de hospedadores de los virus individuales, existen adenovirus distintos en primates, bovinos, caninos, aves, murciélagos, peces y reptiles (Hoeben & Uil, 2013; Van der Vliet & Hoeben, 2006). Los adenovirus humanos son virus sin envoltura con un genoma de ADN bicatenario lineal cuyo tamaño varía entre 34 y 37 kB. Los adenovirus humanos (HAdV) se pueden dividir en siete especies o subgrupos (A-G) que se subdividen a su vez en aproximadamente 67 tipos, inicialmente basados en la serología y más recientemente en secuencias del genoma completo (Lion, 2014). Existe una diversidad global en la prevalencia de los tipos de adenovirus humanos, y algunos tipos son más frecuentes que otros (Berk, 2007; Wold and Horwitz, 2007; Lynch & Kajon, 2016). La gama de hospedadores de los adenovirus humanos generalmente está restringida a una especie hospedadora y está guiada por el o los receptores de entrada usados (revisado por Arnberg, 2015). La mayoría de los tipos se unen al receptor del virus coxsackie y del adenovirus (CAR), excepto los virus de los subgrupos B, D, F y G, que son más promiscuos. Tipos particulares de HAdV-B y HAdV-D pueden unirse al receptor del

complemento CD46, desmogleína 2, ácidos siálicos o CD80/CD86 (Arnberg et al., 2002; Gaggar et al., 2003; Short et al., 2006; Wang et al., 2011).

5 La unión al receptor de entrada está mediada por el dominio "perilla" de la proteína de fibra sobre el cual se establecen interacciones secundarias a través del "bucle RGD" de la proteína base de pentón. Esto eventualmente conduce a la captación del virión en la célula hospedadora mediada por clatrina (Zhang & Bergelson, 2005). El virus progenie se libera por lisis de la célula, lo que se atribuye al potencial oncolítico del virus (Shtrichman & Kleinberger, 1998). Cabe señalar que, si bien la replicación de HAdV no está inherentemente restringida a las células cancerosas, se pueden utilizar modificaciones como la delección de E1B-55K o E1A-delta24 para generar virus que sean selectivos para las células tumorales (revisado en Larson et al., 2015).

10 El HAdV-5 se explora con mayor frecuencia para su uso como vector viral y virus oncolítico. HAdV-5 es uno de los adenovirus más prevalentes en la población humana y la mayoría de las personas presentan inmunidad neutralizante (Vogels et al., 2003). Los virus oncolíticos derivados de HAdV-5 han demostrado una fuerte potencia oncolítica en modelos preclínicos in vitro e in vivo. Si bien los experimentos preclínicos iniciales in vitro e in vivo demostraron la seguridad y la eficacia del enfoque del virus oncolítico, los resultados de los estudios clínicos han sido más moderados y variables. (Toth & Wold, (2010) Viruses 2: 1844-1866; Thomas et al., Mol Ther. 2008;16:1665-1673). Aunque es tentador especular que esto se debe en gran medida a los diferentes niveles de inmunidad neutralizante entre los pacientes, el pequeño número de pacientes incluidos en la mayoría de los estudios, las variaciones en las vías de administración usadas y las diferentes dosis de virus oncolíticos aplicadas en los estudios impiden una estimación del impacto de la inmunidad neutralizante en la eficacia antitumoral de la terapia con virus oncolíticos. Además, hay escasez de datos accesibles sobre la presencia de inmunidad preexistente en los pacientes incluidos en estos estudios.

25 La mayoría de los anticuerpos neutralizantes (nAbs) se dirigen contra las principales proteínas de la cápside, que incluyen el hexón, la fibra y la base de pentón (Bauer et al., 2005). Se han realizado intentos de eludir la inmunidad de la población a los adenovirus, por ejemplo, empleando serotipos humanos raros que se encuentran en la naturaleza o rediseñando serotipos de alta prevalencia para evadir la neutralización inmunitaria (Barnadas et al., 2018; Shashkova, May, & Barry, 2010). Aunque elegantes, estas estrategias son laboriosas y pueden afectar la producción y la estabilidad física de los virus resultantes y hasta el momento, este enfoque no ha producido nuevos virus oncolíticos.

30 Existe una necesidad de nuevos virus oncolíticos para su uso como agentes anticancerígenos.

El documento WO2010/051367 A1 divulga un vector recombinante que comprende secuencias de adenovirus de simio 43, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 y un gen heterólogo bajo el control de secuencias reguladoras y una línea celular que expresa el(los) gen(es) de adenovirus de simio 43, 45, 46, 47, 48, 49 y 50.

35 El documento WO2010/138675 A1 divulga un vector recombinante que comprende secuencias de adenovirus de simio 41 y dos aislados del mismo, y un gen heterólogo bajo el control de secuencias reguladoras y una línea celular que expresa genes del adenovirus de simio 41.

El documento WO2012/024351 A2 divulga métodos de ensamblaje de adenovirus modificados, bibliotecas de módulos de genes adenovirales y composiciones de los mismos.

40 El documento WO2009/073103 A2 divulga un vector recombinante que comprende adenovirus de simio 27, 28, 32, 33 y/o 35 y un gen heterólogo bajo el control de secuencias reguladoras en una línea celular que expresa el(los) gen(es) de adenovirus de simio 27, 28, 32, 33 y 35.

Tao Cheng et al., "A novel oncolytic adenovirus based of simian adenovirus serotype 24" Oncotarget, vol. 8, no. 16, 18 April 2017, pages 26871-26885 divulga AdC7-SP/E1A-ΔE3 para su uso en el tratamiento del cáncer.

Breve resumen de la divulgación

45 Los inventores han estudiado el uso potencial de adenovirus de primates no humanos (NHP) en la terapia con virus oncolíticos.

La invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 57; o SEQ ID NO: 93.

50 En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de fibra que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos SEQ ID NO: 56; o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO:92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO:92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO:92; además opcionalmente en la que el polipéptido de fibra comprende la secuencia de

aminoácidos de: residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO:92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO:92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO:92 además opcionalmente, en la que el polipéptido de fibra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56 o 92.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón que comprende:

- (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; o
- (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 26.

En otro aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica:

(a) el polipéptido de hexón del aspecto mencionado anteriormente de la invención y:

- 10 (i) el polipéptido de fibra del aspecto mencionado anteriormente de la invención;
- (ii) el polipéptido de base de pentón del aspecto mencionado anteriormente de la invención; o
- (iii) el polipéptido de fibra del aspecto mencionado anteriormente de la invención y el polipéptido de base de pentón del aspecto mencionado anteriormente de la invención; o

15 (b) un polipéptido de base de pentón que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y;

(i) un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 23 y/o

20 (ii) un polipéptido de fibra que tiene al menos 95 % de identidad con al menos uno de los residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO:22; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico codifica:

(i) un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;

25 (ii) un polipéptido de hexón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; o

(iii) un polipéptido de hexón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico aislada se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 (a) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 y su complemento;
- (b) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 36 y su complemento; y
- (c) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 71 y su complemento.

En un aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la presente invención.

35 En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico de la presente invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un adenovirus de primate no humano aislado que tiene una cápside que comprende un polipéptido de cápside de al menos uno de:

40 (a) un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; o SEQ ID NO: 93;

(b) un polipéptido de fibra que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; o

45 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92;

ES 3 018 628 T3

(c) un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de al menos uno de: SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92;

(d) un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o 92;

5 (e) un polipéptido de base de pentón que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 26; o

10 (f) un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o 96; opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón de (a) y un polipéptido de fibra seleccionado de (b) a (d), y opcionalmente un polipéptido de base de pentón seleccionado de (e) a (f).

En un aspecto, el adenovirus comprende:

15 (i) el polipéptido de la cápside es un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26, opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26; o

20 (ii) la proteína de la cápside se selecciona de un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; o

25 (iii) la proteína de la cápside se selecciona de un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92; y un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92; y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.

30 En un aspecto, el adenovirus es condicionalmente replicativo; y/o el adenovirus carece de:

(a) todo o una parte del gen E1; y/o

(b) todo o parte del gen E1A; opcionalmente en la que el E1A tiene una delección I\24.

35 En un aspecto, el adenovirus comprende además los elementos cis del adenovirus del lado izquierdo y del lado derecho necesarios para la replicación y la encapsidación, opcionalmente en la que los elementos cis necesarios para la replicación y la encapsidación comprenden una repetición terminal invertida del lado izquierdo del adenovirus y una repetición terminal invertida del lado derecho del adenovirus, y señales de encapsidación.

En otro aspecto, la invención proporciona un genoma de adenovirus de primate no humano aislado que codifica el adenovirus de la presente invención.

40 En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un adenovirus, genoma, secuencia de ácido nucleico aislada, vector o proteína de la presente invención, y un excipiente, adyuvante, diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, dicha composición es para su uso en la orientación a una célula que tiene un receptor adenoviral en un sujeto.

45 En un aspecto, dicha composición es para su uso en terapia, opcionalmente en la que la composición es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

Breve descripción de los dibujos

La invención es según las reivindicaciones. Cualquiera de las siguientes figuras que no estén dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención y se proporcionan sólo con fines comparativos.

La figura 1 muestra el desarrollo de placas virales a lo largo del tiempo en células humanas HER911 en cultivo de monocapa. Los cultivos fueron expuestos a diversas concentraciones de cada uno de los 12 NHP-Ads aislados (líneas sólidas). Se controló el desarrollo de placas virales todos los días durante 9 días. Todos los virus produjeron placas en las células HER911 y los títulos de las reservas variaron entre 3×10^7 y 2×10^9 unidades formadoras de placas/mL. Las placas se desarrollaron con una cinética similar al control wtHAdV5 (líneas discontinuas).

La figura 2 muestra un árbol filogenético en el que se han indicado los seis aislados de NHP-AdV. Para asignar tentativamente los aislados de adenovirus a los niveles de subgrupo, las secuencias de nucleótidos de los aislados NHP_002, 005, 006, 007, 008 y 012 se alinearon con secuencias de nucleótidos del genoma completo representativo de cada uno de los tipos humanos HAdV-01 a HAdV-71.

La figura 3 muestra un ensayo de neutralización. Para comprobar si la inmunidad humoral humana es capaz de reconocer los adenovirus derivados de NHP, los inventores evaluaron si la preparación de IgG humana agrupada derivada de más de 1000 donaciones era capaz de neutralizar los virus NHP_002, 005, 006, 007, 008 y 012 elegidos. Un día antes de la titulación, se sembraron células HER911 en una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. El día de la infección, una serie de diluciones dobles de Nanogam® (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) se preparó a partir de 2.5 mg/mL (1:4) en DMEM suplementado con 2 % de suero de caballo (HS). Cada dilución se mezcló con 100 unidades formadoras de placas (PFU) de virus en un volumen de 1:1 y se incubó durante 45 minutos a 37 °C para permitir que los anticuerpos se unieran al virus. Se utilizó como control el virus sin Nanogam. Se retiró el medio de cultivo de las células HER911 y se reemplazó por una dilución de 100 µL de IVIg:virus. Cada condición fue probada por triplicado. La supervivencia celular se leyó después de la tinción con violeta de cristal 4 días después de la infección. La cantidad de violeta unido se leyó por absorbancia a 595 nm después de disolver el colorante en metanol. El experimento se realizó por triplicado y se mostró el promedio de las tres lecturas.

La figura 4 muestra un árbol filogenético en el que se han indicado seis de los aislados de NHP-AdV. La posición de los adenovirus NHP recién aislados se muestra en un filograma sin raíz de los adenovirus humanos de los subgrupos A-C y E-G.

La figura 5 muestra una descripción esquemática de la generación del plásmido vectorial NHP-007 (pNHP-007).

La figura 6 muestra que el plásmido vector NHP-007 es infeccioso cuando se transfiere a las células y que contiene todos los elementos necesarios para el ciclo de replicación de la infección y que el virus resultante conserva su actividad lítica en las células humanas. A) HER911 se transfectaron con 0.5-15 µg del plásmido NHP-007. Las fotografías fueron tomadas a 1, 3 y 6 dpi. B) El sobrenadante que contenía los viriones NHP-007 recién formados se pasó a través de un filtro de 0.45 µm y se agregó una dilución 1:40 o 1:20 del sobrenadante a un cultivo de células HER911 y A549. Las fotografías fueron tomadas a 24 hpi. C) Después de 48 horas, se recogió el sobrenadante de los cultivos de células HER911 y A549 (solo 1:40) y se congeló/descongeló durante tres ciclos. El título se determinó mediante ensayo de placa a los 7 dpi.

Descripción detallada

La presente invención proporciona nuevas secuencias de ácidos nucleicos, vectores, adenovirus, genotipos, genomas y composiciones para su uso en terapia, particularmente para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

El término "ácido nucleico" como se usa en el presente documento por lo general se refiere a un oligómero o polímero (preferiblemente un polímero lineal) de cualquier longitud compuesto esencialmente de nucleótidos. Una unidad de nucleótido comúnmente incluye una base heterocíclica, un grupo azúcar y al menos uno, por ejemplo, uno, dos o tres, grupos fosfato, incluidos grupos fosfato modificados o sustituidos. Las bases heterocíclicas pueden incluir, entre otras, bases de purina y pirimidina tales como adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), que están ampliamente distribuidas en los ácidos nucleicos naturales, otras bases naturales (por ejemplo, xantina, inosina, hipoxantina), así como bases modificadas química o bioquímicamente (por ejemplo, metiladas), no naturales o derivadas. Los grupos de azúcar pueden incluir, entre otros, grupos pentosa (pentofuranosa), tales como preferiblemente ribosa y/o 2-desoxirribosa, comunes en los ácidos nucleicos de origen natural, o grupos de azúcar arabinosa, 2-desoxiarabinosa, treosa o hexosa, así como grupos de azúcar modificados o sustituidos. Los ácidos nucleicos como se definen en el presente documento pueden incluir nucleótidos de origen natural, nucleótidos modificados o mezclas de los mismos. Un nucleótido modificado puede incluir una base heterocíclica modificada, una unidad estructural de azúcar modificada, un grupo fosfato modificado o una combinación de los mismos. Se pueden introducir modificaciones de grupos fosfato o azúcares para mejorar la estabilidad, la resistencia a la degradación enzimática o alguna otra propiedad útil. El término ácido nucleico abarca además preferiblemente moléculas híbridas de ADN, ARN y ADN ARN, incluyendo específicamente ARNhn, pre-ARNm, ARNm, ADNc, ADN genómico, productos de amplificación, oligonucleótidos e híbridos de ADN, ARN o ADN ARN sintéticos (por ejemplo, sintetizados químicamente). Un ácido nucleico puede ser de origen natural, por ejemplo, presente o aislado de la naturaleza;

o puede ser de origen no natural, por ejemplo, recombinante, es decir, producido mediante tecnología de ADN recombinante, y/o sintetizado parcial o totalmente, química o bioquímicamente. Un ácido nucleico puede ser bicatenario, parcialmente bicatenario o monocatenario. En los adenovirus, el ácido nucleico lineal que forma el genoma viral por lo general tiene polipéptidos derivados del precursor de la proteína terminal (pTP) acoplados covalentemente a cada uno de los extremos 5' de la cadena de polinucleótidos. Cuando es monocatenario, el ácido nucleico puede ser la cadena sentido o la cadena antisentido. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal. Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos.

Los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento. El extremo N de una proteína (también conocido como extremo amino, extremo NH₂, extremo N-terminal o extremo amina) es el comienzo de una proteína o polipéptido terminado por un aminoácido con un grupo amino libre (-NH₂). Por convención, las secuencias de péptidos se escriben del extremo N al extremo C (de izquierda a derecha). El extremo C (también conocido como extremo carboxilo, extremo carboxi, cola C-terminal, extremo C-terminal o extremo COOH) es el extremo de una cadena de aminoácidos (proteína o polipéptido), terminado por un grupo carboxilo libre (-COOH).

Determinadas secuencias proporcionadas en el presente documento se describen usando el porcentaje de identidad con una secuencia, con una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico definida. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir brechas en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines de comparación). La longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación puede ser al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 82 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas y la longitud de cada brecha, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. Preferiblemente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Preferiblemente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de brecha de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y el que se debe utilizar si el profesional no está seguro acerca de qué parámetros se deben aplicar para determinar si una molécula está dentro de una limitación de identidad u homología de secuencia de la invención) es una matriz de puntuación BLOSUM 62 con una penalización de brecha de 12, una penalización de extensión de brecha de 4 y una penalización de brecha de desplazamiento de marco de 5.

Como alternativa, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Meyers et al. (1989) *CABIOS* 4:11-17) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas en el presente documento se pueden utilizar como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410). Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con brechas para fines de comparación, se puede utilizar BLAST con brechas como se describe en Altschul et al. (1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402). Al utilizar programas BLAST y XBLAST con brechas, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Un polinucleótido o región de polinucleótido (o un polipéptido o región polipeptídica) tiene un cierto porcentaje (por ejemplo, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) de "identidad de secuencia" con otra secuencia. Esto significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de bases (o aminoácidos) son los mismos al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Preferiblemente, se usan parámetros predeterminados para la alineación. Un programa de alineación es BLAST, que usa parámetros predeterminados. En particular, los programas son BLASTN y BLASTP, que utilizan los siguientes parámetros predeterminados: Código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambos; valor de corte = 60; expectativa = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank + CDS traducciones + SwissProtein + SPupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. Los términos "xx % de identidad de secuencia" e "xx % de identidad" se usan indistintamente en el presente documento.

El término "aislado" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico, polipéptido o adenovirus que no se encuentra en su entorno natural. El ácido nucleico, polipéptido o adenovirus puede por lo tanto ser de origen sintético (o alternativamente, de origen natural original, pero aislado de su entorno natural). De acuerdo con lo anterior, cuando los ácidos nucleicos, polipéptidos o adenovirus están presentes, por ejemplo, en una composición farmacéutica (que comprende adyuvantes, etc.), se considera que están en forma aislada, ya que no están en su entorno natural. Las secuencias de ácidos nucleicos y/o secuencias de aminoácidos también se consideran "aisladas" cuando no están vinculadas funcionalmente con el resto del entorno del genoma/proteoma en el que se encuentran naturalmente.

El término "vector" es bien conocido en la técnica y, como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, ADN bicatenario. En un ejemplo, el vector tiene una secuencia de ácido nucleico exógeno insertada en él. Se puede utilizar adecuadamente un vector para transportar una molécula de ácido nucleico insertada a una célula hospedadora adecuada. Un vector por lo general contiene todos los elementos necesarios que permiten transcribir la molécula de ácido nucleico insertada y, preferiblemente, traducir la transcripción en un polipéptido. Un vector por lo general contiene todos los elementos necesarios para que, una vez que el vector está en una célula hospedadora adecuada, pueda replicarse independientemente o coincidiendo con el ADN cromosómico del hospedador; se pueden generar varias copias del vector y su molécula de ácido nucleico insertada. Los vectores de la presente invención pueden ser vectores episomales (es decir, que no se integran en el genoma de una célula hospedadora), o pueden ser vectores que se integran en el genoma de la célula hospedadora. Esta definición incluye tanto vectores virales como no virales. Los vectores no virales incluyen, pero no se limitan a, vectores plasmídicos (por ejemplo, pMA-RQ, vectores pUC, vectores bluescript (pBS) y pBR322 o derivados de los mismos que carecen de secuencias bacterianas (minicirculos)), vectores basados en transposones (por ejemplo, vectores PiggyBac (PB) o vectores Sleeping Beauty (SB)), etc. Se pueden utilizar vectores más grandes, tales como cromosomas artificiales (bacterias (BAC), levaduras (YAC) o humanos (HAC)) para acomodar insertos más grandes. En un ejemplo particular, un vector descrito en el presente documento puede ser, por lo tanto, un vector plasmídico. Tales vectores plasmídicos pueden estar presentes dentro de una célula. En un ejemplo, por lo tanto, se puede proporcionar una célula que comprende un vector (por ejemplo, un plásmido como se describe en el presente documento) que comprende una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento. Por lo tanto, se puede proporcionar una célula que comprenda una secuencia de ácido nucleico de la invención.

Un vector como se define en el presente documento también puede ser un vector viral. Un "vector viral" se define como un virus o partícula viral producido de forma recombinante que comprende un polinucleótido que se administrará a una célula hospedadora, ya sea in vivo, ex vivo o in vitro. Los ejemplos de vectores virales incluyen vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de alfavirus y similares. Por lo general, pero no necesariamente, los vectores virales son deficientes en replicación porque han perdido la capacidad de propagarse en una célula determinada debido a que los genes virales esenciales para la replicación han sido eliminados del vector viral. Sin embargo, algunos vectores virales también pueden adaptarse para replicarse específica o preferencialmente en una célula determinada, tal como por ejemplo, una célula cancerosa, y se usan por lo general para desencadenar la (onco)lisis específica de la célula (cancerosa). Estos vectores virales se denominan en el presente documento "virus oncolíticos". Los virosomas son un ejemplo no limitante de un vector que comprende elementos tanto virales como no virales, en particular combinan liposomas con un virus VIH o de la gripe inactivado (Yamada et al., 2003). Otro ejemplo abarca los vectores virales mezclados con lípidos catiónicos.

La presente invención proporciona nuevas secuencias de ácidos nucleicos, vectores, adenovirus, genotipos, genomas y composiciones que por lo general se definen por una secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos correspondiente a una proteína de la cápside adenoviral de primates no humanos o un fragmento de la misma.

Una "proteína de la cápside" se refiere a una proteína en la cápside de un adenovirus o un fragmento funcional o derivado del mismo que participa en la determinación del serotipo y/o tropismo de un adenovirus en particular. Existen varias proteínas de la cápside, incluidas la hexona, la fibra y la base de pentón.

5 Un "polipéptido de hexón" como se usa en el presente documento se refiere al componente predominante de la proteína de la cápside de un adenovirus. También se incluyen dentro de este término los fragmentos funcionales y derivados del polipéptido de hexón. El polipéptido de hexón comprende "regiones hipervariables" (HVR), que son porciones del polipéptido que varían ampliamente entre diferentes genotipos de adenovirus y se unen a anticuerpos neutralizantes. Las HVR se pueden identificar por las posiciones de residuos de aminoácidos que ocupan dentro del polipéptido de hexón de los nuevos polipéptidos de hexón descritos en el
10 presente documento.

Una diana de los anticuerpos neutralizantes contra los adenovirus es el polipéptido de hexón. Es posible reemplazar el polipéptido de hexón o las HVR, con el polipéptido de hexón o las HVR de adenovirus que son raros en la población humana, tal como las secuencias de adenovirus de chimpancé, gorila, orangután o bonobo descritas en el presente documento. Ventajosamente, esto permite la construcción de vectores de adenovirus
15 que serían menos susceptibles a la neutralización por anticuerpos que se encuentran comúnmente en los seres humanos.

Si bien el polipéptido de hexón es la principal proteína de la cápside, otra proteína presente como parte de la cápside adenoviral es un polipéptido de fibra, que también es una diana de los anticuerpos neutralizantes contra los adenovirus. Un "polipéptido de fibra" se refiere a una proteína de fibra de adenovirus, fragmentos
20 funcionales y derivados de la misma. Reemplazar la proteína de fibra o las secuencias variables dentro de la proteína de fibra (el dominio "perilla", "eje" o "cola") con la proteína de fibra o las secuencias variables de adenovirus que son raros en la población humana, tales como las secuencias de adenovirus de bonobo, gorila, orangután o chimpancé descritas en el presente documento, también puede permitir la construcción de vectores de adenovirus que serían menos susceptibles a la neutralización por anticuerpos que se encuentran
25 comúnmente en los humanos. Una combinación del reemplazo de fibra con reemplazos de hexones descritos en el presente documento puede conferir resistencia adicional a la neutralización por anticuerpos comúnmente presentes en poblaciones humanas.

Otro polipéptido de la cápside es el polipéptido de base de pentón. Los polipéptidos de base de pentón forman el capsómero de vértice que funciona como la base pentomérica a la que se unen los trímeros de fibra. Este
30 polipéptido ha sido implicado en la entrada de células adenovirales. Un "polipéptido de base de pentón" se refiere a la proteína de base de pentón del adenovirus, fragmentos funcionales y derivados de los mismos.

Un "adenovirus de primates no humanos", como se usa en el presente documento, se refiere a un adenovirus que se aísla de primates distintos de los humanos. Por lo general, el término adenovirus de primates no humanos se usa para referirse a los adenovirus derivados de simios (es decir, aquellos derivados de
35 chimpancés, bonobos, orangutanes o gorilas).

"Genotipo de adenovirus", "tipo de adenovirus" o "serotipo de adenovirus", como se usan en el presente documento, se usan para referirse a cualquier adenovirus que pueda asignarse a cualquiera de los miembros actualmente conocidos del género Mastadenovirus, cuyos aislados humanos se clasifican en los subgrupos A-G, y se extiende además a cualquier tipo de adenovirus aún no identificado o no clasificado. Véase, por ejemplo,
40 Strauss, "Adenovirus infections in humans," en *The Adenoviruses*, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984) y Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," en *Fields Virology*, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265- 2267 (2001).

Agrupamiento de secuencias de ácidos nucleicos con adenovirus del subgrupo B

Secuencias de hexones

45 Se proporcionan en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con: los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23; residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57; o los residuos de aminoácidos 139 a 453 de SEQ ID NO: 93. Estas regiones del hexón representan las regiones hipervariables de los nuevos hexones proporcionados en el presente documento (es
50 decir, para NHP 007, NHP 012 y NHP 006 respectivamente).

La secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID
55 NO: 23. Los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 007 descrito en el presente documento.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98.5 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 23. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 23.

5 Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 81 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57. Los
10 residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 012 descrito en el presente documento.

En este ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99.5 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 57. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 57.

15 En un ejemplo alternativo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos
20 139 a 453 de SEQ ID NO: 93. Los residuos de aminoácidos 139 a 453 de SEQ ID NO: 93 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 006 descrito en el presente documento.

En este ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 88.5 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 93. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico
25 aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 93.

Secuencias de fibras

También se proporcionan en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de
30 secuencia con al menos uno de los residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92. Las regiones
35 de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 22 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 007 descrito en el presente documento; las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 56 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 012 descrito en el presente documento; y de manera similar, las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 92 representan los dominios
40 "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 006 descrito en el presente documento).

La secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, dos o
45 tres de los residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 68 % de identidad con los residuos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22. Como alternativa, la secuencia de
50 ácido nucleico aislada puede codificar una secuencia que tiene al menos 60 % de identidad con los residuos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar una secuencia que tiene al menos 83 % de identidad con los residuos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22. Por ejemplo, el polipéptido de fibra codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de
55 identidad con la SEQ ID NO: 22.

Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 22.

al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de los residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 % de identidad con los residuos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 61 % de identidad con los residuos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86 % de identidad con los residuos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56. Por ejemplo, el polipéptido de fibra codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 56.

En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 63 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de los residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 68 % de identidad con los residuos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 63 % de identidad con los residuos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92. Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 86 % de identidad con los residuos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92. Por ejemplo, el polipéptido de fibra codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 71 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 92.

Base de pentón

También se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 26. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 26.

Como alternativa, también se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 60. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 60.

Como alternativa, también se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 96. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 96.

Combinaciones

Una secuencia de ácido nucleico aislada proporcionada en el presente documento puede incluir cualquier combinación (es decir, al menos dos, al menos tres, etc.) de las secuencias de base de hexón, pentón y fibra individuales (o fragmentos de las mismas, por ejemplo, HVR, eje, cola y perilla, etc.) proporcionadas en el presente documento.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra como se define en el presente documento; y (ii) un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y además codifica un polipéptido de fibra como se define en el presente documento y también un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento.

En un ejemplo, una secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23, 57 o 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22, 56 o 92; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26, 60 o 96.

5 Por lo tanto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, o SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22, 56 o 92 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26, 60 o 96.

10 En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26.

15 En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con al menos uno de: residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22 y/o residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22; y (ii) un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 26. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con al menos uno de: residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; y/o los residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22; y opcionalmente también un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 26. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón que comprende los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra que comprende: residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; y los residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22; y opcionalmente también un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.

20 En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 57 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 57, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60.

25 En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con al menos uno de: residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; y/o los residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56; y (ii) un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con al menos uno de: residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; y/o los residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56; y opcionalmente también un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón que comprende los residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra que comprende: residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; y los residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56; y opcionalmente también un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

30 En un ejemplo adicional, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96.

96. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22, y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96.

5 En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de 56; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60.

10 En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96.

15 En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96.

20 En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60.

25 También se proporciona en el presente documento una secuencia de ácido nucleico de adenovirus de primate no humano aislada, en la que la secuencia comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 y su complemento.

Además, en el presente documento también se proporciona una secuencia de ácido nucleico de adenovirus de primate no humano aislada alternativa, en la que la secuencia comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 36 y su complemento.

30 También se proporciona una secuencia de ácido nucleico de adenovirus de primate no humano aislada, en la que la secuencia comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 71 y su complemento.

35 Arriba se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos. También se proporcionan vectores que comprenden estas secuencias de ácidos nucleicos. El vector puede ser un vector adenoviral. Preferiblemente, el vector viral es un vector adenoviral oncolítico.

También se proporcionan en el presente documento polipéptidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos descritas.

Adenovirus del subgrupo B (similares)

40 También se describen en el presente documento nuevos adenovirus NHP que se identifican con los adenovirus del subgrupo B humano. Los nuevos adenovirus se definen por al menos una nueva proteína de cápside, por ejemplo, hexón, base de pentón y/o fibra (o fragmentos de las mismas, por ejemplo, HVR.). Las nuevas proteínas de la cápside ya se han descrito en detalle en el contexto de las secuencias de dominios de cola, perilla o eje ácidos nucleicos que las codifican (arriba). Los adenovirus NHP correspondientes se describen en detalle a continuación.

45 Secuencias de hexones

Se proporcionan en el presente documento adenovirus NHP aislados que tienen una cápside que comprende al menos polipéptido de cápside, por ejemplo, un polipéptido de hexón.

50 El polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con: los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23; residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57; o los residuos de aminoácidos 139 a 453 de SEQ ID NO: 93. Estas regiones del hexón representan las regiones hipervariables de los nuevos hexones proporcionados en el presente documento (es decir, para NHP 007, NHP 012 y NHP 006 respectivamente).

El polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos

94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23. Residuos de aminoácidos 139 a 455 de SEQ ID NO: 23 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 007 descrito en el presente documento.

5 Por ejemplo, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98.5 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 23. En otras palabras, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a SEQ ID NO: 23.

10 Como alternativa, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 81 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57. Residuos de aminoácidos 139 a 452 de SEQ ID NO: 57 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 012 descrito en el presente documento.

En este ejemplo, el polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 %, al menos 99.5 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 57. En otras palabras, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a SEQ ID NO: 57.

15 En un ejemplo alternativo, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 453 de SEQ ID NO: 93. Residuos de aminoácidos 139 a 453 de SEQ ID NO: 93 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 006 descrito en el presente documento.

20 En este ejemplo, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 88.5 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 93. En otras palabras, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a SEQ ID NO: 93.

Secuencias de fibras

También se proporcionan en el presente documento adenovirus NHP aislados que tienen una cápside que comprende al menos polipéptido de cápside, por ejemplo, un polipéptido de fibra.

30 El polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con al menos uno de los residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92. Las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 22 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 007 descrito en el presente documento; las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 56 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 012 descrito en el presente documento; y de manera similar, las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 92 representan los dominios "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 006 descrito en el presente documento.

45 El polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, dos o tres de los residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 69 % de identidad con los residuos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 60 % de identidad con los residuos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 84 % de identidad con los residuos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 22.

55 Como alternativa, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de los residuos de aminoácidos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56; residuos de

aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 60 % de identidad con los residuos 128 a 321 de SEQ ID NO: 56. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 61 % de identidad con los residuos 75 a 127 de SEQ ID NO: 56. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 86 % de identidad con los residuos 1 a 74 de SEQ ID NO: 56. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 56.

En otro ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 63 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de: residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 68 % de identidad con los residuos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 63 % de identidad con los residuos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92. Como alternativa, el polipéptido puede tener al menos 86 % de identidad con los residuos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 71 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 92.

Base de pentón

También se proporcionan en el presente documento adenovirus NHP aislados que tienen una cápside que comprende al menos polipéptido de cápside, por ejemplo, un polipéptido de base de pentón.

El polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 26. En otras palabras, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 26.

Como alternativa, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 60. En otras palabras, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 60.

Como alternativa, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 96. En otras palabras, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 96.

Combinaciones

Los adenovirus NHP aislados proporcionados en el presente documento tienen una cápside que incluye cualquier combinación (es decir, al menos dos, al menos tres, etc.) de las secuencias de aminoácidos individuales de hexón, base de pentón y fibra proporcionadas en el presente documento.

De acuerdo con lo anterior, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra como se define en el presente documento; y (ii) un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento. En un ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y comprende además un polipéptido de fibra como se define en el presente documento y también un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento.

En un ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, o SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22, 56 o 92; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26, 60 o 96.

El adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 57, o SEQ ID NO: 93, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22, 56 o 92 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26, 60 o 96.

En un ejemplo, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 23, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 22 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 26.

En otro ejemplo, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 56 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 96.

En otro ejemplo, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 93, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 92 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 60.

Secuencias de ácidos nucleicos del subgrupo C (similares)

Secuencias de hexones

Se proporcionan en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con: los residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 129; los residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 163; o los residuos de aminoácidos 139 a 456 de SEQ ID NO: 197. Estas regiones del hexón representan las regiones hipervariables de los nuevos hexones proporcionados en el presente documento (es decir, para NHP 002, NHP 005 y NHP 008 respectivamente).

La secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 87 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 129. Residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 129 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 002 descrito en el presente documento.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 129. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 129.

Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 76 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 444 de SEQ ID NO: 163. Residuos de aminoácidos 139 a 444 de SEQ ID NO: 163 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 005 descrito en el presente documento.

En este ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 163. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 163.

En un ejemplo alternativo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 456 de SEQ ID NO: 197. Residuos de aminoácidos 139 a 456 de SEQ ID NO: 197 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 008 descrito en el presente documento.

En este ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99.5 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 197. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 197.

Secuencias de fibra

También se proporcionan en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con al menos uno de: residuos de aminoácidos 388 a 577 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 76 a 387 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 392 a 581 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 76 a 391 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 391 a 580 de SEQ ID NO: 196; residuos de aminoácidos 76 a 390 de SEQ ID NO: 196; o residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 196. Las

regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 128 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 002 descrito en el presente documento; las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 162 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 005 descrito en el presente documento; y de manera similar, las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 196 representan los dominios "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 008 descrito en el presente documento).

La secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 73 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, dos o tres de: residuos de aminoácidos 388 a 577 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 76 a 387 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 82 % de identidad con los residuos 388 a 577 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 73 % de identidad con los residuos 76 a 387 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 89 % de identidad con los residuos 1 a 75 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, el polipéptido de fibra codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 78 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 128.

Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de los residuos de aminoácidos 392 a 581 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 76 a 391 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66 % de identidad con los residuos de aminoácidos 392 a 581 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 55 % de los residuos 76 a 391 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 77 % de identidad con los residuos 1 a 75 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, el polipéptido de fibra codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 64 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, un 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 162.

En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 56 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de los residuos de aminoácidos 391 a 580 de SEQ ID NO: 196; residuos de aminoácidos 76 a 390 de SEQ ID NO: 196; o residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 69 % de identidad con los residuos 391 a 580 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 56 % de identidad con los residuos 76 a 390 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de fibra que comprende al menos 73 % de identidad con los residuos 1 a 75 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, el polipéptido de fibra codificado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 62 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 196.

Base de pentón

También se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 132. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 132.

Como alternativa, también se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 72 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 166. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 166.

Como alternativa, también se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 200. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico aislada puede codificar un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 200.

Combinaciones

Una secuencia de ácido nucleico aislada proporcionada en el presente documento puede incluir cualquier combinación (es decir, al menos dos, al menos tres, etc.) de las secuencias de base de hexón, pentón y fibra individuales (o fragmentos de las mismas, por ejemplo, dominios HVR, de eje, de cola o de perilla) proporcionadas en el presente documento.

De acuerdo con lo anterior, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra como se define en el presente documento; y (ii) un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento. En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y además codifica un polipéptido de fibra como se define en el presente documento y también un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento.

En un ejemplo, una secuencia de ácido nucleico proporcionada en el presente documento puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 163, o SEQ ID NO: 197 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128, 162 o 196; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132, 166 o 200.

Por lo tanto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 163, o SEQ ID NO: 197, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128, 162 o 196 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132, 166 o 200.

En un ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132.

En otro ejemplo, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 163 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 166. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 163, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 166.

En un ejemplo adicional, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 197 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 200. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 197, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 200.

En un ejemplo adicional, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132.

En un ejemplo adicional, la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, en la que la secuencia de ácido nucleico codifica además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132.

Además, en el presente documento también se proporciona una secuencia de ácido nucleico de adenovirus de primate no humano aislada alternativa, en la que la secuencia comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 36 y su complemento.

5 También se proporciona una secuencia de ácido nucleico de adenovirus de primate no humano aislada, en la que la secuencia comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 71 y su complemento.

Arriba se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos. También se proporcionan vectores que comprenden estas secuencias de ácidos nucleicos. El vector puede ser un vector adenoviral. Preferiblemente, el vector viral es un vector adenoviral oncolítico.

10 También se proporcionan en el presente documento polipéptidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos descritas.

Adenovirus del subgrupo C (similares)

15 También se describen en el presente documento nuevos adenovirus NHP que se identifican con los adenovirus del subgrupo C humano. Los nuevos adenovirus se definen por al menos una nueva proteína de cápside, por ejemplo, hexón, base de pentón y/o fibra (o fragmentos de las mismas, por ejemplo, HVR, dominios de cola, perilla o eje). Las nuevas proteínas de la cápside ya se han descrito en detalle en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican (arriba). Los adenovirus NHP correspondientes se describen en detalle a continuación.

Secuencias de hexones

20 Se proporcionan en el presente documento adenovirus NHP aislados que tienen una cápside que comprende al menos polipéptido de cápside, por ejemplo, un polipéptido de hexón.

25 El polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con: los residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 129; residuos de aminoácidos 139 a 444 de SEQ ID NO: 163; o los residuos de aminoácidos 139 a 456 de SEQ ID NO: 197. Estas regiones del hexón representan las regiones hipervariables de los nuevos hexones proporcionados en el presente documento (es decir, para NHP 002, NHP 005 y NHP 008 respectivamente).

30 El polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 87 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 129. Residuos de aminoácidos 137 a 452 de SEQ ID NO: 129 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 002 descrito en el presente documento.

35 Por ejemplo, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 129. En otras palabras, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a SEQ ID NO: 129.

40 Como alternativa, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos 76 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 444 de SEQ ID NO: 163. Residuos de aminoácidos 139 a 444 de SEQ ID NO: 163 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 005 descrito en el presente documento.

En este ejemplo, el polipéptido puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 163. En otras palabras, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a SEQ ID NO: 163.

45 En un ejemplo alternativo, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con los residuos de aminoácidos 139 a 456 de SEQ ID NO: 197. Residuos de aminoácidos 139 a 456 de SEQ ID NO: 197 corresponden a la HVR del nuevo adenovirus NHP 008 descrito en el presente documento.

50 En este ejemplo, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99.5 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 197. En otras palabras, el polipéptido de hexón puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea idéntica a SEQ ID NO: 197.

Secuencias de fibra

También se proporcionan en el presente documento adenovirus NHP aislados que tienen una cápside que comprende al menos polipéptido de cápside, por ejemplo, un polipéptido de fibra.

El polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con al menos uno de los siguientes: residuos de aminoácidos 388 a 577 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 76 a 387 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 392 a 581 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 76 a 391 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 391 a 580 de SEQ ID NO: 196; residuos de aminoácidos 76 a 390 de SEQ ID NO: 196; o residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 196. Las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 128 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 002 descrito en el presente documento; las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 162 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 005 descrito en el presente documento; y de manera similar, las regiones de aminoácidos definidas para SEQ ID NO: 196 representan los dominios de "perilla", "eje" y "cola" respectivamente de la proteína de fibra para el nuevo adenovirus NHP 008 descrito en el presente documento.

El polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 73 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, dos o tres de: residuos de aminoácidos 388 a 577 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 76 a 387 de SEQ ID NO: 128; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 128.

Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 82 % de identidad con los residuos 388 a 577 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 73 % de identidad con los residuos 76 a 387 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 89 % de identidad con los residuos 1 a 75 de SEQ ID NO: 128. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 78 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 128.

Como alternativa, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de: residuos de aminoácidos 392 a 581 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 76 a 391 de SEQ ID NO: 162; residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede tener al menos 66 % de identidad con los residuos de aminoácidos 392 a 581 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede tener al menos 55 % de los residuos 76 a 391 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede tener al menos 77 % de identidad con los residuos 1 a 75 de SEQ ID NO: 162. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 64 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 162.

En otro ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con al menos uno, al menos dos o tres de: residuos de aminoácidos 391 a 580 de SEQ ID NO: 196; residuos de aminoácidos 76 a 390 de SEQ ID NO: 196; o residuos de aminoácidos 1 a 75 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 69 % de identidad con los residuos 391 a 580 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 56 % de identidad con los residuos 76 a 390 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, el polipéptido puede tener al menos 73 % de identidad con los residuos 1 a 75 de SEQ ID NO: 196. Por ejemplo, el polipéptido de fibra puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 62 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 196.

Base de pentón

También se proporcionan en el presente documento adenovirus NHP aislados que tienen una cápside que comprende al menos polipéptido de cápside, por ejemplo, un polipéptido de base de pentón.

El polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 132. En otras

palabras, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 132.

5 Como alternativa, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 72 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 166. En otras palabras, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 166.

10 Como alternativa, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 74 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 200. En otras palabras, el polipéptido de base de pentón puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 200.

Combinaciones

15 Los adenovirus NHP aislados proporcionados en el presente documento tienen una cápside que incluye cualquier combinación (es decir, al menos dos, al menos tres, etc.) de las secuencias de aminoácidos individuales de hexón, base de pentón y fibra proporcionadas en el presente documento.

20 De acuerdo con lo anterior, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra como se define en el presente documento; y (ii) un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento. En un ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón como se define en el presente documento, y comprende además un polipéptido de fibra como se define en el presente documento y también un polipéptido de base de pentón como se define en el presente documento.

25 En un ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 163, o SEQ ID NO: 197 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128, 162 o 196; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132, 166 o 200.

El adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 163, o SEQ ID NO: 197, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128, 162 o 196, y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132, 166 o 200.

30 En un ejemplo, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132.

35 En otro ejemplo, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 163 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 166. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 163, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 166.

40 En un ejemplo adicional, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 197 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 200. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 197, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 200.

45 En un ejemplo adicional, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 162 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132.

50 En un ejemplo adicional, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196; y (ii) un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132. Por ejemplo, el adenovirus NHP puede tener una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129, en la que la cápside comprende además un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 196 y también un polipéptido de base de pentón de SEQ ID NO: 132.

55 En un ejemplo adicional, el adenovirus NHP tiene una cápside que comprende un polipéptido de hexón de SEQ ID NO: 129 y al menos uno de: (i) un polipéptido de fibra de SEQ ID NO: 128; y (ii) un polipéptido de base de

Combinaciones de los subgrupos B y C

Como se indica en el presente documento, las secuencias de ácidos nucleicos y/o polipéptidos específicos proporcionados en el presente documento para diversas proteínas de la cápside se pueden combinar, por ejemplo, para formar una secuencia de ácidos nucleicos quiméricos o una cápside de adenovirus quimérico. A lo largo de la solicitud se hace referencia a varias de estas combinaciones, por ejemplo, combinaciones de diferentes secuencias de hexones, pentones y/o fibras (o fragmentos de los mismos). Como se indica en el presente documento, estas combinaciones pueden incluir secuencias obtenidas de diferentes aislados. Además, quedaría claro que estas combinaciones también podrían incluir secuencias obtenidas de diferentes subgrupos. A modo de ejemplo no limitativo, una o más secuencias obtenidas de NHP 007 pueden combinarse con una o más secuencias obtenidas de NHP 002. Por lo tanto, en el presente documento se contemplan y abarcan explícitamente combinaciones de una o más secuencias obtenidas de uno cualquiera de NHP 007, 012, 006, 002, 005 y/o 008.

Características generales de los adenovirus

Los adenovirus descritos anteriormente pueden incluir una o más características o modificaciones adicionales, como se describe a continuación.

Para evitar daños a los tejidos normales como resultado del uso de una terapia adenoviral de dosis alta, se prefiere que cuando el adenovirus se use con fines terapéuticos se incluya una mutación que facilite su replicación, y por consiguiente su actividad oncolítica, en las células tumorales pero que lo vuelva esencialmente inofensivo para las células normales. Este enfoque aprovecha la observación de que muchos de los mecanismos reguladores del crecimiento celular que controlan el crecimiento celular normal se inactivan o se pierden en las células neoplásicas, y que estos mismos mecanismos de control del crecimiento son inactivados por los virus para facilitar la replicación viral. De este modo, la delección o inactivación de un gen viral que inactiva un mecanismo particular de control del crecimiento celular normal impedirá que el virus se replique en células normales, pero tales virus se replicarán y matarán a las células neoplásicas que carezcan del mecanismo particular de control del crecimiento.

Por ejemplo, las células normales en división carecen transitoriamente del mecanismo de control del crecimiento, el supresor tumoral del retinoblastoma (RB), que falta y está asociado con el crecimiento sin restricciones en determinadas células neoplásicas. La pérdida de la función del gen supresor de tumores (RB) del retinoblastoma se ha asociado con la etiología de diversos tipos de tumores. El producto de este gen supresor de tumores, un polipéptido de 105 kilodalton llamado pRB o p105, es una proteína reguladora del ciclo celular. El polipéptido pRB inhibe la proliferación celular al detener las células en la fase G del ciclo celular. La proteína pRB es una diana principal de varias oncoproteínas de virus de ADN, incluido el adenovirus E1A, que se une a pRB y lo inactiva, y esta inactivación es importante para facilitar la replicación viral. Las regiones de la unión de la proteína E1A a pRB fueron mapeadas por Whyte et al., 1988, Whyte et al., 1989. La proteína pRB interactúa con el factor de transcripción E2F, que está involucrado en la expresión del gen E2 del adenovirus y varios genes celulares, e inhibe la actividad de este factor de transcripción (Bagchi et al. (1991) Cell 65 : 1063 ; Bandara et al. (1991) Nature 351 : 494 ; Chellappan et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 89 : 4549).

En consecuencia, un adenovirus que es "condicionalmente replicativo" se usa para referirse a una variante adenoviral que carece de la capacidad de formar complejos con RB pero que retiene sustancialmente otras funciones replicativas esenciales para presentar un fenotipo competente para la replicación en células que son deficientes en la función de RB (por ejemplo, células que son homocigotas o heterocigotas para alelos RB sustancialmente suprimidos, células que comprenden alelos RB que codifican proteínas RB mutantes que son esencialmente células no funcionales que comprenden mutaciones que resultan en una falta de función de una proteína RB) pero que no presentará sustancialmente un fenotipo replicativo en células no replicativas, no neoplásicas. Tales adenovirus de replicación condicional (también conocidos como "CRAds") también se conocen como adenovirus $\Delta 24$ E1A. La delección $\Delta 24$ es un ejemplo de una delección específica en HAdV5 E1A para producir un adenovirus de replicación condicional (véase, por ejemplo, la tabla 6 en la sección de ejemplos a continuación, que proporciona las secuencias para los elementos de unión de RB codificados por el gen E1A para cada nuevo adenovirus descrito en el presente documento). Para evitar dudas, estas secuencias específicas pueden suprimirse del adenovirus como "delección $\Delta 24$ " para evitar la unión de la proteína E1A a la proteína RB. De esta manera, la replicación del adenovirus $\Delta 24$ queda restringida a aquellas células en las que la vía RB está perturbada.

Se puede seleccionar una delección funcional de E1 o una delección funcional de E3, entre otras. El término "suprimido funcionalmente" o "delección funcional" significa que se elimina o daña de otro modo una cantidad suficiente de la región genética, por ejemplo, mediante mutación o modificación, de modo que la región genética ya no es capaz de producir productos funcionales de expresión genética.

Los adenovirus descritos en el presente documento pueden comprender además los elementos cis-actuantes del adenovirus del extremo izquierdo y del extremo derecho necesarios para la replicación y la encapsulación.

Convencionalmente, el genoma lineal está orientado de tal manera que la unidad de transcripción E1 se ubica en el lado izquierdo del genoma lineal y la región E4 en el lado derecho. Los elementos cis necesarios para la replicación y la encapsulación pueden comprender una repetición terminal invertida del extremo izquierdo del adenovirus y una repetición terminal invertida del extremo derecho del adenovirus, cada una de las cuales
 5 contiene los orígenes de la replicación del ADN viral. Además, los elementos que actúan en cis necesarios pueden comprender las señales de encapsulación que por lo general se ubican dentro de los primeros 600 nucleótidos del lado izquierdo del genoma del adenovirus.

Composiciones farmacéuticas y usos médicos

También se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica, en la que la composición
 10 comprende un adenovirus, genotipo, genoma, secuencia de ácido nucleico aislada, vector o proteína y un excipiente, adyuvante, diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes reguladores, conservantes, portadores compatibles, agentes potenciadores inmunológicos suplementarios tales como adyuvantes y citocinas y, opcionalmente, otros agentes o compuestos terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es biológicamente ni de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con la proteína de unión seleccionada sin causar ningún efecto biológico indeseable ni interactuar de manera perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido.

Los excipientes son sustancias naturales o sintéticas formuladas junto con un ingrediente activo (por ejemplo, un adenovirus, genotipo, genoma, secuencia de ácido nucleico aislada, vector o proteína), incluidas con el propósito de aumentar el volumen de la formulación o conferir una potenciación terapéutica al ingrediente activo en la forma de dosificación final, tal como facilitar la absorción o solubilidad del fármaco. Los excipientes también pueden ser útiles en el procedimiento de fabricación, para ayudar en el manejo de la sustancia activa en cuestión, tal como, facilitando la fluidez del polvo o las propiedades antiadherentes, además de ayudar a la
 20 estabilidad in vitro, tal como, previniendo la desnaturalización durante la vida útil esperada. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, un excipiente adecuado es fácilmente identificable por un experto en la técnica. A modo de ejemplo, los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares.

Los adyuvantes son agentes farmacológicos y/o inmunológicos que modifican el efecto de otros agentes en una formulación. Los adyuvantes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, un experto en la técnica puede identificar fácilmente un adyuvante adecuado.

Los diluyentes son agentes diluyentes. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, un experto en la técnica puede identificar fácilmente un diluyente adecuado.

Los portadores no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y son compatibles con otros ingredientes de la formulación. El término "portador" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, un experto en la técnica puede identificar fácilmente un portador adecuado.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para dirigirse a células con un receptor para adenovirus. "Dirigido a células con un receptor para adenovirus" se usa en el presente documento para definir una célula que tiene un receptor de superficie celular que está unido y/o actúa como ligando para una proteína de la cápsida (es decir, un hexón, una base de pentón, una fibra o un fragmento de los mismos).

Los términos "individuo", "sujeto", "anfitrión" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier sujeto para quien se desea un diagnóstico, tratamiento o terapia. Para los fines de la presente divulgación, el sujeto puede ser un primate, preferiblemente un ser humano, u otro mamífero, tal como un perro, gato, caballo, cerdo, cabra o bovino, y similares.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden utilizar en terapia o en un método para tratar una enfermedad o afección. Los términos "tratamiento" y "terapia" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a reducir, mejorar o eliminar uno o más signos, síntomas o efectos de una enfermedad o afección. Los términos "terapia" y "tratamiento" se usan en el sentido más amplio y se interpretan como que abarcan cualquier intervención médica que tenga como objetivo prevenir la aparición de una afección médica, o reducir la manifestación de la afección médica, o tratar de curar la causa raíz de la enfermedad, o cualquier variación de lo anterior. Los términos "prevenir" o "prevención" se usan aquí para
 50 referirse a detener o reducir la probabilidad del desarrollo de síntomas asociados con la enfermedad.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden usarse para tratar específicamente el cáncer. El cáncer que se trata puede ser cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma maligno o glioblastoma.

5 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden formularse como una vacuna. En este caso, las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse según los métodos bien conocidos en la técnica.

Se proporciona en el presente documento un método para tratar una enfermedad, el método puede comprender administrar una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, la "administración" o "administración" de una composición farmacéutica descrita en el presente documento a un sujeto incluye cualquier vía de introducción o suministro a un sujeto que permita que la composición realice su función prevista. La administración puede llevarse a cabo por cualquier vía adecuada, incluida la oral, intranasal, intraocular, oftálmica, parenteral (intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea) o tópica. La administración incluye la autoadministración y la administración por otro. La composición se puede administrar como una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una dosis o concentración plasmática en un sujeto que proporciona el efecto farmacológico específico para el cual se administran las composiciones descritas, por ejemplo, para tratar una enfermedad de interés en un sujeto diana. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar según la vía de administración y la forma de dosificación, la edad y el peso del sujeto y/o la enfermedad o afección que se esté tratando.

20 Los aspectos de la invención se demuestran mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Se presentan adenovirus aislados de primates no humanos y que están destinados al uso clínico. Los adenovirus de primates no humanos se usan como base para la generación de agentes oncolíticos basados en adenovirus que se utilizarán en la terapia con virus oncolíticos, para la generación de portadores basados en adenovirus de vacunas heterólogas y para la generación de vectores de transferencia genética que se utilizarán en la terapia genética humana. Los adenovirus fueron aislados de muestras de heces de chimpancés, bonobos, orangutanes y gorilas occidentales, todos ellos mantenidos en cautiverio. Se eligió un panel de virus para un mayor desarrollo basándose en su capacidad de replicarse en células humanas, su capacidad de infectar y matar células tumorales humanas y su distinción genética con respecto a los adenovirus aislados de humanos. Se aislaron los ácidos nucleicos derivados del virus y se determinaron las secuencias de nucleótidos completas de estos virus. Todos los virus de primates no humanos (NHP) son genéticamente distintos de todos los serotipos de adenovirus aislados de humanos. Se construyeron clones de plásmidos que transportan el genoma viral NHP-007 y se utilizaron para la generación de variantes genéticamente modificadas. A partir de estos virus, se generaron variantes selectivas de células cancerosas mediante la eliminación de los codones que codifican el dominio de unión a RB de las proteínas E1A. Estos virus, y los vectores derivados de ellos, evitan los efectos inactivadores de la inmunidad preexistente en los receptores humanos que resultó de una exposición previa, a menudo asintomática, al tipo de adenovirus del que se derivó el agente terapéutico. Constituyen por tanto nuevos agentes virales que pueden utilizarse en aplicaciones terapéuticas en oncología, como portadores de vacunas heterólogas y como portadores de transgenes en estrategias terapéuticas de terapia génica.

Sección experimental

45 Para aislar nuevos adenovirus, se obtuvieron muestras de heces de chimpancés (*Pan troglodytes*), bonobos (*Pan paniscus*), gorilas occidentales (*Gorilla gorilla*) y orangutanes (*Pongo pygmaeus*), mantenidos en cautiverio en zoológicos. Los virus se aislaron esencialmente como lo describen Roy et al., (2009). Se volvieron a suspender alícuotas fecales de 250 a 500 mg en 5 mL de solución salina regulada con fosfato sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (PBS⁻) mediante agitación exhaustiva (3 x 20 s) en un mezclador vórtex. La suspensión se eliminó mediante centrifugación durante 5 minutos en una centrifuga de sobremesa a 6000xg. De la suspensión clarificada se aislaron 4 mL y se pasaron dos veces a través de un filtro de baja unión a proteínas de 0.45 µm. El filtrado se recogió y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

50 De cada uno de los filtrados se agregaron alícuotas de 100 µL y 10 µL a cultivos de células HER 911 (Fallaux et al., 1996) cultivadas en placas de 6 pocillos en DMEM suplementado con 8 % de suero bovino fetal (FBS), penicilina (100 UI/mL), strep (100 µg/mL), gentamicina (200 µg/mL) y fungizona (2 µg/mL). Los cultivos se inspeccionaron cada dos días para detectar signos de efectos citopáticos (CPE). El CPE por lo general apareció entre 4 y 21 días después de la exposición al filtrado. Cuando >10 % de las células exhibieron CPE, se recolectaron las células lavándolas de la placa con el medio y se recolectaron en un tubo de polipropileno de 10 mL. Las células en el medio se lizaron mediante congelación/descongelación tres veces, después de lo cual los restos celulares se peletizaron mediante centrifugación en una centrifuga de sobremesa durante 3 minutos a 6000xg. Del lisado celular se agregaron 200 µL a un cultivo fresco casi confluyente de células HER911

cultivadas en una placa de 9 cm en DMEM suplementado con 8 % FBS, penicilina (100 UI/mL), estreptomycin (100 µg/mL), gentamicina (200 µg/mL) y Fungizona (2 µg/mL). Cuando el CPE estaba casi completo, se recogió el medio con las células y las células se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación. Los lisados se aclararon mediante centrifugación en una centrifuga de sobremesa durante 3 minutos a 6000xg. Los lisados se almacenaron a -20°C.

A partir de estos datos, los inventores concluyeron que habían aislado agentes virales que pueden replicarse en las células humanas HER911. Para confirmar que estos lisados contienen adenovirus, cultivos casi confluentes de células HER911 en placas de 6 cm se expusieron a 100 µL del sobrenadante que contenía el virus. Entre 2 y 6 días después de la infección, todos los cultivos mostraron un CPE marcado. Las células se recogieron en el medio y se sometieron a un procedimiento de extracción HIRT optimizado para el aislamiento del ADN del adenovirus. Las células se peletizaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 1500xg durante 3 minutos. Las pellas se lavaron una vez en PBS y posteriormente se agregaron 600 µL de mezcla de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.6 % SDS) y las pellas celulares se volvieron a suspender suavemente. Posteriormente se agregaron 150 µL de NaCl 5M y se dejó reposar el tubo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se agregaron 600 µL de isopropanol y después de mezclar suavemente los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se centrifugó el tubo a 16.000xg durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las pellas se volvieron a suspender en 40 µl de Tris 10 mM, EDTA 1 mM con RNasa (50 µg de RNasa/mL) y se incubó a 37 °C durante 20 min. Posteriormente, las muestras se trataron con proteinasa K y se limpiaron mediante extracción con fenol/cloroforno según técnicas estándar.

Se utilizaron aproximadamente 10 ng de ADN para la amplificación por PCR de las regiones variables del hexón het usando los siguientes cebadores: 5'-CAGGATGCTTCGGAGTACCTGAG-3' (deg hexón directo) (SEQ ID NO: 210) y 5'-TTGGCNGG DATDGGGTAVAGCATGTT-3' (deg hexón reverso) (SEQ ID NO: 211), en las que la 'N' se usa para indicar cualquier base, 'D' indica A, G o T, y 'V' indica A, C o G. Estos cebadores se eligieron para que coincidieran con las secuencias de ADN de consenso que codifican las regiones constantes que flanquean las regiones hipervariables de las proteínas hexón de los adenovirus de primates humanos y no humanos. El uso de estos cebadores en una reacción de PCR estándar (30 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C, 1 minuto a 95 °C) produjo una señal en todas las muestras, pero no en un extracto de ADN de una célula HER911 no infectada. Esto indicó que todos los extractos de heces contienen adenovirus. Los análisis de secuencia de los productos de PCR revelaron una variedad de secuencias. Se eligió una selección de doce secuencias distintas para un estudio más detallado, indicadas con LUMC NHP-001 a LUMC NHP-012.

Para verificar que esta selección de virus era capaz de replicarse eficientemente en células HER911, los inventores cuantificaron el rendimiento de los virus en los cultivos 911 en un ensayo de placa estándar. Se utilizaron diluciones de los lisados que contenían el virus para infectar cultivos casi confluentes de células 911 en medio DMEM que contenía 2 % de FBS; 2-4 horas después de la infección, el medio se reemplazó por medio MEM con 0.65 % de agarosa. Se controló el desarrollo de las placas a intervalos regulares y se contaron hasta que el número de placas alcanzó una meseta. Todos los virus formaron placas fácilmente detectables (Figura 1) con una cinética similar al desarrollo de placas con el adenovirus humano tipo 5 (HAdV5), que se incluyó en el experimento para servir como referencia. El rendimiento final difirió considerablemente entre los distintos aislados, lo que puede atribuirse al uso de condiciones no optimizadas para la producción de las reservas iniciales (Tabla 1).

Tabla 1: Títulos de adenovirus funcionales de los lisados en bruto recolectados tres días después de la infección de cultivos casi confluentes de células HER911. Los rendimientos de adenovirus se determinaron mediante un ensayo de placa en células HER911 mantenidas bajo una capa de agar. Los títulos del virus se leyeron 9 días después de la infección.

<u>Virus</u>	<u>Título (PFU/mL)</u>
HAdV5	9,75E+08
NHP_001	1,55E+08
NHP_002	1,40E+08
NHP_003	3,60E+08
NHP_004	2,78E+08
NHP_005	1,88E+07
NHP_006	2,05E+09
NHP_007	1,20E+09

ES 3 018 628 T3

NHP_008	2,25E+08
NHP_009	7,75E+07
NHP_010	1,23E+08
NHP_011	4,23E+08
NHP_012	1,08E+09

5 Para evaluar el uso potencial de estos adenovirus, se produjo un lote de siembra del virus en matraces de cultivo de tejidos 2-T75 para cada uno de los aislados del virus. Los lisados de congelación y descongelación aclarados se dividieron en alícuotas y se almacenaron hasta su uso posterior. Cada uno de los 12 aislados se probó en un panel de células tumorales que consiste en células de glioblastoma, células de cáncer de próstata, células de cáncer de páncreas y células de cáncer de vejiga usando un MOI de 5 y 25. La viabilidad de los cultivos se leyó después de 72 y 120 horas después de la infección (Tabla 2 y Tabla 3).

10 Se utilizaron las siguientes líneas celulares: Glioblastoma: GS343peri, GS304, GS203, GS281, GS324core, GS245, GS186core, GS452, GS365 y GS436; Cáncer de vejiga: T24, HCV29, TCCsup, RT4, J82, 5637 y UMUC3Luc2; Cáncer de páncreas: PatuS, HPAF-II, Mia-PaCa2, RLT-PSC, BxPC3, PatuT y PANC-1; y cáncer de próstata: 22RVI, C42B4, Pro4Luc2, Du145 y PnT2C2.

Tipo de tumor	Linea celular	Virus												
		HAdV5	NHP_001	NHP_002	NHP_003	NHP_004	NHP_005	NHP_006	NHP_007	NHP_008	NHP_009	NHP_010	NHP_011	NHP_012
Glioblastoma	GS343peri	1.32	1.63	1.53	1.77	1.60	2.46	1.80	1.94	2.54	1.73	1.84	1.98	2.34
	GS304	0.78	1.18	1.03	1.22	1.09	1.19	1.28	1.35	1.34	1.50	1.36	1.44	1.50
	GS203	0.50	0.77	0.60	0.88	0.89	0.96	1.17	1.15	1.05	0.87	1.03	1.05	1.16
	GS281	0.51	0.78	0.63	0.90	0.86	1.18	1.02	0.90	1.25	0.98	1.01	1.05	0.86
	GS324core	0.30	0.85	0.67	1.06	1.00	0.96	1.23	0.35	1.42	1.19	1.21	1.28	0.35
	GS245	0.82	0.93	0.73	0.90	0.78	0.84	0.73	0.69	0.83	0.86	0.81	0.87	0.73
	GS186core	0.35	0.85	0.76	0.96	0.76	0.43	0.78	0.70	1.00	0.86	0.89	0.83	0.54
	GS452	0.35	0.60	0.59	0.65	0.75	0.90	0.73	0.64	0.97	0.66	0.68	0.63	0.57
	GS365	0.42	0.44	0.32	0.51	0.46	0.87	0.57	0.44	1.13	0.55	0.53	0.57	0.52
	GS436	0.07	0.25	0.15	0.27	0.29	0.26	0.39	0.13	0.42	0.21	0.26	0.23	0.10
Vejiga	T24	0.84	0.87	1.00	0.99	1.06	0.76	0.41	0.20	1.12	0.89	1.00	0.93	0.07
	HCV29	0.93	0.90	1.01	0.99	0.99	0.78	0.16	0.13	1.02	0.89	0.99	1.01	0.22
	TCCsup	0.57	0.33	0.47	0.52	0.80	0.48	0.29	0.36	0.49	0.29	0.39	0.43	0.17
	RT4	0.24	0.32	0.25	0.35	0.58	0.53	0.05	0.01	0.57	0.36	0.41	0.20	0.03
	J82	0.16	0.10	0.14	0.63	0.47	0.28	0.05	0.02	0.69	0.12	0.17	0.32	0.01
	5637	0.14	0.13	0.20	0.19	0.26	0.23	0.18	0.05	0.34	0.10	0.17	0.10	0.07
	UMUC3Luc2	0.03	0.03	0.10	0.07	0.15	0.06	0.22	0.13	0.23	0.06	0.10	0.06	0.05
Páncreas	PatuS	0.77	0.38	0.51	0.77	0.61	0.26	0.45	0.30	0.78	0.45	0.82	0.57	0.24
	HPAF-II	1.04	0.26	0.45	0.62	0.75	0.42	0.16	0.04	1.01	0.33	1.06	0.46	0.13
	Mia-PaCa2	0.12	0.22	0.40	0.56	0.42	0.16	0.42	0.26	1.21	0.36	0.91	0.24	0.15
	RLT-PSC	0.14	0.08	0.22	0.20	0.25	0.12	0.40	0.10	0.68	0.15	0.30	0.18	0.16
	BxPC3	0.29	0.14	0.19	0.27	0.25	0.24	0.14	0.05	0.37	0.20	0.34	0.21	0.09
	PatuT	0.07	0.06	0.12	0.15	0.17	0.14	0.49	0.05	0.77	0.11	0.32	0.18	0.11
	PANC-1	0.06	0.09	0.26	0.25	0.33	0.08	0.13	0.04	0.48	0.12	0.28	0.19	0.08
Próstata	2ZRVI	0.21	0.12	0.44	0.14	0.47	0.13	0.31	0.07	0.65	0.06	0.33	0.07	0.30
	CA284	0.06	0.08	0.17	0.25	0.21	0.08	0.10	0.05	1.09	0.08	0.47	0.09	0.07
	Pro4Luc2	0.04	0.10	0.17	0.13	0.13	0.14	0.09	0.04	0.32	0.10	0.19	0.07	0.04
	Du145	0.05	0.06	0.13	0.14	0.13	0.19	0.08	0.03	0.23	0.08	0.11	0.07	0.04
	PnT2C2	0.03	0.03	0.07	0.03	0.06	0.09	0.05	0.01	0.10	0.05	0.05	0.02	0.04

Tabla 2: Viabilidad celular a MOI 25 y 5 dpi para glioblastoma, cáncer de vejiga, próstata y páncreas.

Tipo de tumor	Linea celular	Virus												
		HAdV5	NHP_001	NHP_002	NHP_003	NHP_004	NHP_005	NHP_006	NHP_007	NHP_008	NHP_009	NHP_010	NHP_011	NHP_012
Glioblastoma	GS343peri	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS304	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS203	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS281	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	GS324core	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
	GS245	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
	GS186core	2	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1
	GS452	2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
Vejiga	GS365	2	2	2	1	2	0	1	2	0	1	1	1	1
	GS436	3	2	3	2	2	2	2	3	2	3	2	3	3
	T24	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	3
	HCV29	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3
	TCCsup	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3
	R74	3	2	3	2	1	1	3	3	1	2	2	4	4
	J82	3	3	3	1	2	2	3	3	1	3	3	2	3
	SG37	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3
UMUC3Luc2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
Páncreas	PatuS	0	2	1	0	1	2	2	2	0	2	0	1	3
	HPAF-II	0	2	2	1	0	2	3	3	0	2	0	2	3
	Mia-PaCa2	3	3	2	1	2	3	2	2	0	2	0	3	3
	RL:PSC	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	2	3	3
	8xPC3	2	3	3	2	3	3	3	3	2	3	2	3	3
	PatuT	3	3	3	3	3	3	2	3	0	3	2	3	3
	PANC-1	3	3	2	3	2	3	3	3	2	3	2	3	3
Próstata	ZZRVI	3	3	2	3	2	3	2	3	1	3	2	3	2
	C4284	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3
	Pro4Luc2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
	Du145	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	PnT2C2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tabla 3: Puntuación de viabilidad celular clasificada en MOI 25 y 5 dpi para células de cáncer de glioblastoma, vejiga, próstata y páncreas tras la adición de NHP (la viabilidad celular de >75 % corresponde a una puntuación de eficacia oncolítica de 0; la viabilidad celular de <75 % - 50 % corresponde a una puntuación de eficacia oncolítica de 1; la viabilidad celular de <50 % - 25 % corresponde a una puntuación de eficacia oncolítica de 2 y <25 % corresponde a una puntuación de eficacia oncolítica de 3).

Un día antes de la infección, se sembraron células a 5000 células/pocillo en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos en DMEM suplementado con 10 % de FBS o medio de cultivo específico para células. Las placas para las líneas de células de glioblastoma derivadas de pacientes se recubrieron con Matrigel antes de la siembra. Las líneas celulares fueron expuestas a cada uno de los aislados del virus NHP y, como control, a HAdV5. Cada uno de los virus se evaluó a MOI 5 y 25 en el medio de cultivo apropiado con 2 % FBS. Como controles adicionales se incluyeron controles no infectados y controles de fondo (medio de cultivo sin células). Todas las condiciones se realizaron por triplicado. La viabilidad celular se determinó 120 horas después de la infección mediante el kit de reactivo de proliferación celular WST-1 (Merck) según el protocolo del fabricante.

Existe una variedad considerable en la viabilidad celular de los cultivos infectados con adenovirus NHP para las líneas celulares probadas. Algunas líneas celulares expuestas al virus presentan un aumento en la lectura de viabilidad celular, lo que puede atribuirse a los efectos promotores del ciclo celular y del metabolismo de la infección viral. A menudo se observa que este aumento precede a la disminución que es resultado de la muerte celular inducida por el virus. En general, las líneas celulares de cáncer de próstata parecen ser las más sensibles a la oncólisis inducida por virus, seguidas por las líneas celulares de cáncer de páncreas y vejiga (Tabla 3). Las líneas celulares de glioblastoma fueron relativamente insensibles a la infección por adenovirus, excepto una línea celular (GS436). Dos líneas de células de cáncer de vejiga (T24 y HCV29) fueron destruidas selectivamente por NHP_006, NHP_007 y NHP_012. Al calificar los aislados de NHP por su potencial oncolítico (Tabla 3: efecto insignificante (<75 % de viabilidad celular) = 0 pts; efecto menor (>75 % - 50 % < viabilidad celular) = 1 pts; efecto moderado (> 50 % - 25 % < viabilidad celular) = 2 pts; y efecto fuerte (> 25 % viabilidad celular) = 3 pts) los 3 principales candidatos fueron NHP_012 (65 pts), NHP_007 (64 pts) y NHP_002 (57 pts) (Tabla 4). Sorprendentemente, los tres superaron a HAd5 (55 puntos). Al considerar los 3 principales candidatos, ningún otro aislado se atribuyó al alcance de las líneas de células cancerosas que podrían ser el objetivo, aparte de NHP_005, que demostró el efecto oncolítico más fuerte (moderado) en la línea de células

de glioblastoma GS186core de todos los aislados de NHP. Por lo tanto, los inventores eligieron NHP_012, NHP_007, NHP_002 y NHP_005 como nuestros candidatos iniciales para un mayor desarrollo como vectores oncolíticos.

Tabla 4: Puntuaciones sumadas de eficacia oncolítica por virus.

Virus	Ninguno	Menor	Moderado	Fuerte	Total (pts)
NHP_012	4	4	2	19	65
NHP_007	4	3	5	17	64
NHP_002	4	6	6	13	57
HAdV5	7	3	5	14	55
NHP_006	6	3	8	12	55
NHP_001	9	1	6	13	52
NHP_009	9	2	5	13	51
NHP_011	9	3	3	14	51
NHP_005	10	1	6	12	49
NHP_003	10	6	4	9	41
NHP_004	12	2	7	8	40
NHP_010	12	2	9	6	38
NHP_008	16	4	6	3	25

5

Para comprobar si la inmunidad humoral humana es capaz de reconocer los adenovirus derivados de NHP, los inventores evaluaron si la preparación de IgG humana agrupada derivada de más de 1000 donaciones era capaz de neutralizar los virus NHP_002, 005, 006, 007, 008 y 012 elegidos. Un día antes de la titulación, se sembraron células HER911 en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pocillos. El día de la infección, se preparó una serie de diluciones dobles de Nanogam®. (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) se preparó a partir de 2.5 mg/mL (1:4) en DMEM suplementado con 2 % de suero de caballo (HS). Cada dilución se mezcló con 100 unidades formadoras de placas (PFU) de virus en un volumen de 1:1 y se incubó durante 45 minutos a 37 °C para permitir que los anticuerpos se unieran al virus. Se utilizó como control el virus sin Nanogam. Se retiró el medio de cultivo de las células HER911 y se reemplazó por una dilución de 100 µL de IVIg: virus. La supervivencia celular se leyó después de la tinción con violeta de cristal 4 días después de la infección. La cantidad de cristal violeta unido se leyó por absorbancia a 595 nm después de disolver el colorante en metanol. El experimento se realizó por triplicado y se mostró el promedio de las tres lecturas (Figura 3).

Los NHP-Ads demostraron una neutralización variable por la inmunoglobulina humana combinada. La eficacia de neutralización se determinó mediante el factor de dilución en el que la eficacia oncolítica (medida por la cantidad de células adherentes) se redujo en ≥50 %. La infección por virus del subgrupo C, que incluyen NHP-002, NHP-005 y NHP-008, se inhibió en diluciones más altas (que varían desde 1/256 a 1/1024) y fue comparable a los resultados obtenidos para wtHAd5. Sin embargo, la infección por virus del subgrupo B, que incluye NHP-006, NHP-007 y NHP-012, se inhibió en diluciones mucho más bajas (que varían desde 1/8 a 1/32). No se prevé que concentraciones superiores a una dilución de 1:10 sean representativas de las concentraciones de IVIg que se pueden encontrar en la sangre. Por lo tanto, parece plausible que exista una inmunidad preexistente limitada en la población contra NHP-006, NHP-007 y NHP-012. A la luz de estos resultados, los NHP-Ads del subgrupo B parecen ser los candidatos OV más prometedores para un mayor desarrollo.

Para caracterizar mejor los virus de la lista corta, se determinó la secuencia de nucleótidos de los genomas de los adenovirus. Para este fin, se aisló el ADN del virus de cultivos de células HER911 mediante extracción HIRT y se analizó mediante secuenciación en una plataforma illumine. Los genomas virales se ensamblaron de novo y los genes virales se anotaron comparando las secuencias de ADN con los genomas de adenovirus anotados en las bases de datos de nucleótidos de Genbank en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

Tabla 5: Números de acceso V de Genbank de las secuencias de nucleótidos de longitud completa de los adenovirus usados para generar el árbol filogenético de la figura 2.

35

ES 3 018 628 T3

Tipo de adenovirus		Número de acceso a Genbank
HAdV	01	AC00017
HAdV	02	BK000407
HAdV	03	NC_011203
HAdV	04	AY458656
HAdV	05	BK000408
HAdV	06	FJ349096
HAdV	07	BK005235
HAdV	08	KP016723
HAdV	09	NC_010956
HAdV	10	JN226746
HAdV	11	NC_011202
HAdV	12	X73487
HAdV	13	JN226747
HAdV	14	AY803294
HAdV	15	AB562586
HAdV	16	JN860680
HAdV	17	AF108105
HAdV	18	GU191019
HAdV	19	JQ326209
HAdV	20	JN226749
HAdV	21	KF528668
HAdV	22	JF619037
HAdV	23	JN226750
HAdV	24	JN226751
HAdV	25	JN226752
HAdV	26	JF153474
HAdV	27	JN226753
HAdV	28	JF824826
HAdV	29	JN226754
HAdV	30	JN226755
HAdV	31	AM749299
HAdV	32	JN226756
HAdV	33	JN226758
HAdV	34	AY737797

ES 3 018 628 T3

HAdV	35	AC_000019
HAdV	36	GQ384080
HAdV	37	AB448778
HAdV	38	JN226759
HAdV	39	JN226760
HAdV	40	KU162869
HAdV	41	DQ315364
HAdV	42	JN226761
HAdV	43	JN226762
HAdV	44	JN226763
HAdV	45	JN226764
HAdV	46	AY875648
HAdV	47	JN226757
HAdV	48	JF153473
HAdV	49	DQ393829
HAdV	50	AY737798
HAdV	51	JN226765
HAdV	52	DQ923122
HAdV	53	MK116618
HAdV	54	AB448770
HAdV	55	KC857701
HAdV	56	HM770721
HAdV	57	HQ003817
HAdV	58	KF268319
HAdV	59	JF799911
HAdV	60	HQ007053
HAdV	61	JF964962
HAdV	62	JN162671
HAdV	63	JN935766
HAdV	64	EF121005
HAdV	65	AP012285
HAdV	66	JN860676
HAdV	67	AP012302
HAdV	68	JN860678
HAdV	69	JN226748

ES 3 018 628 T3

HAdV	70	KP641339
HAdV	71	KF268207
HAdV	HAdV-B PXHXFX	KF633445
SimAdV	6	MA158592
SimAdV	16.1	MF176115
SimAdV	18	NC_022266
SimAdV	21	BK000412
SimAdV	24	AY530878
SimAdV	27.1	FJ025909
SimAdV	27.2	FJ025928
SimAdV	28.2	FJ025915
SimAdV	29	FJ025904
SimAdV	31.1	FJ025906
SimAdV	31.2	FJ025904
SimAdV	35.2	FJ025910
SimAdV	41.1	FJ025913
SimAdV	42.1	FJ025903
SimAdV	42.2	FJ025902
SimAdV	43	FJ-25900
SimAdV	45	FJ025901
SimAdV	46	FJ025930
SimAdV	47	FJ025929

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos están representadas en la lista de secuencias adjunta. Para asignar tentativamente los aislados de adenovirus a los niveles de subgrupo, las secuencias de nucleótidos de los aislados NHP_002, 005, 006, 007, 008 y 012 se alinearon con secuencias de nucleótidos del genoma completo representativo de cada uno de los tipos humanos HAdV-01 a HAdV-72 (descargadas de la base de datos NCBI Genbank) usando el software MAFFT (versión 7.427 para Windows 64; descargado de <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). A partir de estos datos se construyó un árbol filogenético mediante el software iTOL4 (<https://itol.embl.de/>). Los resultados demuestran que las secuencias NHP_002, 005 y 008 podrían atribuirse tentativamente al subgrupo de adenovirus humanos (formalmente especie) HAdV-C, mientras que las NHP_006, NHP_007 y NHP_012 deberían ubicarse en HAdV-B. Los últimos tres virus albergan 2 genes de ARN VA y, por lo tanto, podrían atribuirse tentativamente al clado HAdV-B:1 (Figuras 2 y 4).

La herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó para inspeccionar las secuencias de aminoácidos de varias proteínas (es decir, hexón, fibra, base de pentón (III), proteasa, proteína IX, proteína de unión al ADN monocatenario (DBP) y polimerasa) codificadas por los genomas en busca de las secuencias más similares en la base de datos.

Para comparar la similitud de las secuencias de nucleótidos de los virus NHP_002, 005, 006, 007, 008 y 012 y los genomas más similares en la base de datos Genbank, se realizaron búsquedas de nucleótidos BLAST usando los parámetros predeterminados. Los uno o más genomas similares se alinearon usando el software MAFFT, y las secuencias alineadas se compararon usando el software Base-By-Base obtenido del Centro de Recursos Bioinformáticos Virales (<https://4virology.net/>).

ES 3 018 628 T3

Las búsquedas BLAST demuestran que el genoma NHP_005 es similar a los genomas SimAdV43 y SimAdV45. Notablemente, las secuencias fueron más diferentes en las posiciones del gen III (que codifica la base del pentón), el gen del hexón, el gen de la fibra y uno de los genes E3.

5 El genoma NHP_002 es similar al de SimAdV42.2 en toda la longitud del genoma, con la excepción del gen hexón.

El genoma NHP_008 es relativamente similar a SimAdV43 en toda su longitud del genoma, con la excepción del gen hexón, que es distinto.

El virus NHP_006 es similar a varios adenovirus de simios, pero parece tener secuencias de fibra y E3 que son marcadamente distintas de otros adenovirus en la base de datos Genbank.

10 El virus NHP_007 es más similar al adenovirus SimAdV28.2 en el lado izquierdo del genoma hasta la región del hexón, mientras que el lado derecho, comenzando con el gen del hexón e incluyendo la región E3 y la fibra, es más similar al virus SimAdV47. Esto sería coherente con que NHP_007 sea el producto de una recombinación natural entre adenovirus similares a SimAdV28.2 y SimAdV47.

15 El virus NHP_012 es el más similar al adenovirus humano SimAdV35.2, desde el lado izquierdo del genoma hasta el gen hexón. El gen hexón de NHP_012 es más similar al gen SimAdV21. La proteasa, el DBP y el gen 100K son muy similares a la secuencia SimAdV35.2, mientras que los genes 22k, 33k y pVII y la región E3 son similares a SimAdV27.2. La fibra y el lado derecho son similares a los virus SimAdV41.1. En conjunto, estos datos sugieren que los adenovirus de simios son productos de la recombinación natural entre genomas de adenovirus.

20 El hexón, la fibra y la base de pentón forman las principales proteínas de la cápside y son ligandos conocidos para anticuerpos neutralizantes. La región E3 codifica proteínas involucradas en la evasión de la respuesta inmunitaria celular. La disimilitud es una evidencia clara de que existe una presión selectiva que impulsa la selección de mutantes de escape que cambiaron la base de pentón, el hexón, la fibra o E3. El hecho de que las secuencias de base de pentón, hexón, fibra y E3 sean a menudo marcadamente distintas de las de los virus descritos anteriormente sugiere que ocasionalmente los genes se intercambian entre virus durante infecciones naturales.

25

Para restringir la replicación de los adenovirus NHP a las células tumorales que tienen defectos en la vía RB, los codones que codifican el elemento de unión a RB en las proteínas E1A. En todos los adenovirus, el dominio de unión a RB de las proteínas E1A se puede identificar fácilmente basándose en la similitud de secuencia del dominio de unión a RB del HAdV-5 (Tabla 6). Los 24 codones que codifican el dominio de unión RB de 8 aminoácidos de longitud se pueden eliminar de los plásmidos que codifican la proteína E1A de los adenovirus NHP.

30

Para mapear los aminoácidos esenciales para la unión de pRB en las diversas proteínas E1A, se alinearon los aminoácidos codificados por el primer exón del gen E1A de los virus NHP 002, 005, 006, 007, 008 y 012 con la secuencia de aminoácidos E1A del adenovirus humano tipo 5 (cf. Avvakumov et al. (2004) Virology 329:477-492). En secuencias alineadas ubicamos las regiones homólogas a la secuencia del adenovirus humano 5 esencial para la unión de RB 'LTCHEAGF' (Fueyo et al. (2000) Oncogene 19, 2-12). Los codones de esta región se pueden suprimir mediante técnicas estándar de biología molecular a partir de clones de plásmidos de los virus NHP.

35

40 Tabla 6: Secuencia de los elementos que interactúan con la proteína del retinoblastoma (RB) en las proteínas E1A del adenovirus, su posición y su secuencia de aminoácidos

Proteína	Posición del 1er AA del elemento	Elemento de unión RB
Exón 1 de HAdV5 E1A	122	LTCHEAGF
NHP_007 E1A exón 1	114	LHCYEEGF
NHP_012 E1A exón 1	115	LHCYEEGF
NHP_006 E1A exón 1	115	LHCYEEGF
NHP_002 E1A exón 1	118	LTCNESGF
NHP_005 E1A exón 1	112	LTCHEPGF
NHP_003 E1A exón 1	119	LTCNESGF
NHP_001 E1A exón 1	118	LTCNESGF

ES 3 018 628 T3

NHP_008 E1A exón 1	111	LTCHEPGF
--------------------	-----	----------

- 5 Muestras de heces usadas para aislar los virus descritos en el presente documento. Las muestras de heces se obtuvieron a través de veterinarios de zoológicos holandeses que albergaban primates no humanos que vivían en cautiverio. Las muestras se obtuvieron de los zoológicos holandeses de Rotterdam (virus Bly), Hilvarenbeek (virus BB), Arnhem (virus BZ) y Apeldoorn (virus AH) en julio de 2013, agosto de 2013, septiembre de 2013 y noviembre de 2013, respectivamente.

Tabla 7: Anotación bioinformática de la secuencia de ácido nucleico NHP007

<u>Anotación NHP007</u>	<u>comenzar</u>	<u>detener</u>	<u>¿Empalmado?</u>
ITR izquierda	1	134	N.A.
E1A	572	1450	Y
E1B 21K	1618	2163	N
E1B 55K	1934	3410	N
IX	3503	3919	N
IVA2	5606	3982	Y
52K	10921	12090	N
pIIIa	12115	13878	N
pol	13918	8459	Y
pTP	13918	5085	Y
base de pentón	13963	15717	N
pVII	15721	16299	N
pV	16342	17394	N
pX	17423	17650	N
pVI	17726	18478	N
hexón	18594	21470	N
proteasa	21501	22130	N
DBP	23783	22221	N
100K	23814	26312	N
22K	26005	26622	N
33K	26005	26890	Y
pvIII	26960	27643	N
E3-12.5K	27643	27960	N
E3-CR1 α	27914	28360	N
E3-19K	28345	28857	N
E3-CR1 β	28884	29522	N
E3-CR1 γ	29541	30296	N

ES 3 018 628 T3

E3-RID α	30306	30581	N
E3-RID β	30586	30987	N
E3-14.7	30980	31387	N
fibra	31620	32588	N
E4-34K	33789	32875	N
E4-ORF6/7	33789	32627	Y
E4-ORF4	34060	33677	N
E4-ORF3	34423	34070	N
E4-ORF2	34809	34420	N
E4-ORF1	35225	34851	N
ITR derecha	35473	35605	N.A.

Tabla 8: Anotación bioinformática de la secuencia de ácido nucleico NHP0012

anotación NHP012	comenzar	detener	¿Empalmado?
ITR izquierda	1	114	N.A.
E1A	569	1448	Y
E1B 21K	1614	2159	N
E1B 55K	1919	3406	N
IX	3449	3915	N
IVA2	3970	5594	Y
52K	10892	12061	N
pIIIa	12089	13852	N
pol	13883	5073	Y
pTP	13883	8450	Y
base de pentón	13925	15616	N
pVII	15628	16206	N
pV	16426	17307	N
pX	17336	17566	N
pVI	17639	18361	N
hexón	18513	21380	N
proteasa	21408	22034	N
DBP	23663	22113	N
100K	23694	26192	N
22K	25888	26505	N
33K	25888	26770	Y

ES 3 018 628 T3

pvIII	26840	27523	N
E3-12.5K	27523	27840	N
E3CR1 α	27794	28240	N
E3-19K	28225	28737	N
E3-CR1 β	28761	29294	N
E3-CR1 γ	29316	29882	N
E3-RID α	30302	30577	N
E3-RID β	30582	30986	N
E3-14.7	30582	30986	N
fibra	31613	32578	N
E4-ORF4	33668	34051	N
E4-34K	33780	32866	N
E4-ORF6/7	33780	32618	Y
E4-ORF3	34414	34061	N
E4-ORF2	34800	34411	N
E4-ORF1	35216	34842	N
ITR derecha	35484	35597	N.A.

Tabla 9: Anotación bioinformática de la secuencia de ácido nucleico NHP005

anotación NHP005	comenzar	detener	¿Empalmado?
ITR izquierda	1	63	N.A.
E1A	546	1459	Y
E1B 21K	1652	2206	N
E1B 55K	1957	3368	N
IX	3559	3960	N
IVA2	5551	4016	Y
52K	10910	12136	N
pIIIa	12162	13949	N
pol	13318	5119	Y
pTP	13318	8499	Y
base de pentón	14018	15883	N
pVII	15912	16526	N
pV	16596	17675	N
pX	17704	17937	N
pVI	18035	18787	N

ES 3 018 628 T3

hexón	18891	21734	N
proteasa	21756	22388	N
DBP	24105	22474	N
100K	24149	26635	N
22K	26316	26635	N
33K	26316	27225	Y
pVIII	27283	27966	N
E3-12.5K	27967	28290	N
E3CR1 α	28800	28290	N
E3-19K	29015	29500	N
E3-RID α	30777	31049	N
E3-RID β	31054	31482	N
E3-14.7	31475	31861	N
fibra	32064	33809	N
E4-ORF6/7	35156	33993	Y
E4-34K	35156	34272	N
E4-ORF4	35421	35056	N
E4-ORF3	35791	35438	N
E4-ORF2	36180	35788	N
E4-ORF1	36215	36598	N
ITR derecha	36969	37034	N.A.

Tabla 10: Anotación bioinformática de la secuencia de ácido nucleico NHP002

anotación NHP002	comenzar	detener	¿Empalmado?
ITR izquierda	1	109	N.A.
E1A	561	1513	Y
E1B 21K	1682	2248	N
E1B 55K	1987	3513	N
IX	3610	4053	N
IVA2	5736	4112	Y
52K	11094	12356	N
pIIIa	12380	14152	N
pol	14212	5218	Y
pTP	14212	8622	Y
base de pentón	14254	16008	N

ES 3 018 628 T3

pVII	16011	17819	N
pV	16701	17819	N
pX	17844	18086	N
pVI	18191	18970	N
hexón	19098	21965	N
proteasa	21995	22630	N
DBP	24388	22751	N
100K	24438	26855	N
22K	26551	27174	N
33K	26551	27491	Y
pvIII	27566	28249	N
E3-12.5K	28250	28567	N
E3CR1 α	29059	29265	N
E3-19K	29262	29741	N
E3-CR1 $\beta\gamma$	29770	30672	N
E3-RID α	30669	31484	N
E33 11.6	30960	31484	N
E3-RID β	31771	32172	N
fibra	32757	34490	N
E4-34K	35733	34949	N
E4-ORF6/7	35833	34673	Y
E4-ORF4	36098	35733	N
E4-ORF3	36455	36108	N
E4-ORFB	36844	36452	N
E4-ORF1	37289	36903	N
ITR derecha	37596	37704	N.A.

Tabla 11: Anotación bioinformática de la secuencia de ácido nucleico NHP006

anotación NHP006	comenzar	detener	orf empalmado
ITR izquierda	1	132	n.a.
E1A	576	1454	Y
E1B 21K	1622	2167	N
E1B 55K	1927	3414	N
IX	3506	3919	N

ES 3 018 628 T3

IVA2	3985	5031	Y
52K	10923	12092	N
pIIIa	12117	13877	N
pol	13921	5088	Y
pTP	13921	8459	Y
base de pentón	13966	15708	N
pVII	15713	16291	N
pV	16334	17386	N
pX	17415	17642	N
pVI	17716	18468	N
hexón	18584	21454	N
proteasa	21485	22114	N
DBP	23765	22203	N
100K	23796	26291	N
22K	25987	26604	N
33K	25987	26872	Y
pVIII	26942	27625	N
E3-12.5K	27625	27942	N
E3-CR1 α	27896	28342	N
E3-19K	28327	28845	N
E3-CR1 γ	28867	29496	N
E3-6.6K	29507	29854	N
E3-RID α	29893	30168	N
E3-RID β	30137	30568	N
E3-14.7	30561	30968	N
fibra	31200	32162	N
E4-34K	33364	32450	N
E4-ORF6/7	33364	32202	Y
E4-ORF4	33635	33252	N
E4-ORF3	33998	33645	N
E4-ORF2	34384	33995	N
E4-ORF1	34800	34426	N
ITR derecha	35048	35179	n.a.

Tabla 12: Anotación bioinformática de la secuencia de ácido nucleico NHP008

ES 3 018 628 T3

anotación NHP008	comenzar	detener	ORF empalmado
ITR izquierda	1	73	N.A.
E1A	546	1459	Y
E1B 21K	1657	2214	N
E1B 55K	1962	3476	N
IX	3567	3968	N
IVA2	5559	4024	Y
52K	10915	12141	N
pIIIa	12167	13951	N
pol	13323	5127	Y
pTP	13323	8507	Y
base de pentón	14021	15991	N
pVII	16020	16628	N
pV	16698	15991	N
pX	17800	18033	N
pVI	18131	18883	N
hexón	18987	21866	N
proteasa	21888	22520	N
DBP	24258	22612	N
100K	24302	26812	N
22K	26493	27092	N
33K	26493	27402	Y
pvIII	27460	28143	N
E3-12.5K	28144	28467	N
E3-19K	29191	29676	N
E3-CR1 β	29721	30140	N
E3-RID α	30953	31225	N
E3-RID β	31230	31658	N
E3-14.7	31651	32037	N
fibra	32243	33985	N
E4-ORF6	35332	34448	N
E4-ORF6/7	35332	34169	Y
E4-ORF4	35597	35232	N
E4-ORF3	35967	35614	N

E4-ORF2	36356	35964	N
E4-ORF1	36774	36391	N
ITR derecha	37128	37200	N.A.

Generación del vector NHP-007

Para generar un clon plasmídico del virus NHP-007 se sintetizó un fragmento de ADN bicatenario sintético que abarcaba los nucleótidos 1-513 del lado izquierdo del NHP-007 y los nucleótidos 34914-35606 del lado derecho. Estos elementos fueron separados por la secuencia 5'-gatatcgaggtaac-3' (SEQ ID NO: 217) para proporcionar sitios de restricción EcoRV y HpaI. El fragmento completo estaba flanqueado por la secuencia 5'-acgcgtatttaaat-3' (SEQ ID NO: 218) para generar sitios de restricción únicos MluI y SmaI. El fragmento se insertó en el plásmido de bajo número de copias pACNR1181 (Bredendiek, PJ et al 2003) para generar plásmidos pACNR1181-adaptador1 oriA.

Para generar un clon plasmídico que contenga todo el genoma de ADN NHP-007, se aisló el ADN genómico NHP-007 de células HER911 infectadas con NHP-007 mediante un protocolo de extracción HIRT modificado. En este protocolo se introdujo una etapa de tratamiento con proteasa para eliminar la proteína terminal unida covalentemente antes de la extracción del ADN. El ADN NHP-007 y el ADN del plásmido pACNR1181-adaptador1 oriA digerido con HpaI-EcoRV en una proporción molecular de 1:1 se introdujeron en células bacterianas de E. coli (Hanahan, D 1983, Kong, Y et al 1999) mediante electroporación. El plásmido sólo se puede recrear mediante recombinación homóloga del ADN NHP-007 con el ADN plasmídico linealizado EcoRV y HpaI (Figura 5). Las colonias que surgieron después de la selección con ampicilina fueron examinadas para determinar el patrón de restricción previsto. Se amplió un clon con el patrón de restricción esperado y se caracterizó aún más mediante análisis de restricción. Se seleccionó la colonia de plásmido pNHP-007_clone 2 para un estudio posterior (en adelante denominada pNHP-007).

Para probar la viabilidad del vector clonado, las células HER911 se transfectaron con el plásmido NHP-007 a diferentes concentraciones y se verificaron las células diariamente para detectar signos de efecto citopático (CPE) (Figura 6A). A partir de los tres días después de la infección (dpi), se pudo observar una presencia de CPE dependiente de la dosis en los cultivos celulares. En la concentración más baja, se había formado una placa fenotípica a los 6 dpi, lo que ilustra la propagación del virus. Para validar que los efectos observados eran de origen viral, el sobrenadante se recogió a los 6 dpi y se congeló/descongeló durante un ciclo antes de pasarlo por un filtro de 0,45 µm, después de lo cual se agregó a un cultivo fresco de células HER911. La línea celular HER911 es una línea de células auxiliares establecida para la producción de vectores adenovirales con región temprana 1 suprimida, y expresa la región temprana 1 (E1) del adenovirus humano tipo 5 (HAdV-C5) (Fallaux, FJ et al 1996). La expresión de HAdV-C5 E1 en HER911 podría sustituir a una E1 no funcional en el vector NHP-007. Por lo tanto, los cultivos de células A549, que no expresan E1, también fueron expuestos al filtrado (Figura 6B). A las 24 horas después de la infección (hpi), todos los cultivos demostraron CPE completo, confirmando de este modo, la presencia de partículas virales infecciosas. No se observaron diferencias en el potencial de replicación del vector NHP-007 en las células HER911 y A549 (Figura 6C).

Generación de la delección Δ24 en pNHP-007

Se ha demostrado que una delección de 24 pb en el dominio de unión del retinoblastoma (Rb) del gen E1A genera un adenovirus mutante con replicación selectiva en células tumorales (Stolarek, R et al 2004). Para crear un mutante de adenovirus Δ24 de pNHP-007, se creó un plásmido mutante por delección de ClaI que abarcaba toda la región E1 y parte de E2. La delección de 24 pb se generó en el mutante de delección de ClaI mediante clonación de ensamblaje in vivo (IVA) (García-Nafria, J et al 2016). El plásmido mutante se introdujo nuevamente en E. coli, como se describió anteriormente. Las colonias que surgieron después de la selección con ampicilina fueron cribadas para determinar el patrón de restricción previsto. Se expandieron y secuenciaron dos clones con el patrón de restricción esperado para validar la delección.

Método para comprobar la viabilidad del pNHP-007

Transfección Un día antes de la transfección, se sembró una placa de 6 pocillos con células HER911 en DMEM suplementado con 8 % de suero fetal bovino (FCS) y pen/strep (DMEM_{COMP}), y creció confluyente durante la noche (o/n). El plásmido NHP-007 se diluyó en OptiMEM usando 0.5-15 µg de plásmido en un volumen total de 100 µL. Asimismo, se diluyeron 3 µL de polietilimina (PEI, 1.0 mg/mL) por µg de ADN en 100 µL de OptiMEM y ambas diluciones se mezclaron 1:1 mediante pipeteo. El medio de las células HER911 se reemplazó por 1 mL de DMEM suplementado con 2 % de FCS y pen/strep (DMEM_{BAJO}) y se agregaron las mezclas a los pocillos. Las células se incubaron a 37 °C/5 % de CO₂ o/n. A la mañana siguiente, el medio fue reemplazado por DMEM_{BAJO} y las células se cultivaron durante otros 5 días. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía a 1, 3 y 6 dpi.

Filtración Un día antes de la infección, se sembraron células HER911 y A549 en una placa de 24 pocillos a 10^5 células/pocillo en DMEM_{COMP} y se incubó toda la noche. El sobrenadante se recogió de los cultivos expuestos a 1.0 µg de plásmido a los 6 dpi y se congeló/descongeló durante un ciclo. A continuación, el sobrenadante se pasó a través de un filtro de jeringa Acrodisc® de 0.45 µm (PALL Life Sciences, PN4148). El medio de los cultivos HER911 y A549 fue reemplazado por DMEM_{BAJO} y el filtrado se agregó directamente a una dilución de 1:20 y 1:40. Las fotografías fueron tomadas mediante microscopía a 24 hpi.

Titulación A las 48 hpi, se recogió el sobrenadante de las células expuestas a 1:40 del filtrado. Como control, el filtrado se diluyó 1:40 en DMEM_{BAJO}. Todas las muestras se congelaron/descongelaron durante tres ciclos y se centrifugaron durante 5 minutos a 3000 rpm para eliminar los restos celulares. Los títulos se determinaron mediante ensayo de placa.

Referencias

Arnberg, N., Pring-Akerblom, P., & Wadell, G. (2002). Adenovirus Type 37 Uses Sialic Acid as a Cellular Receptor on Chang C Cells. *Journal of Virology*, 76(17), 8834-8841. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.17.8834-8841.2002>

Arnberg, Niklas. (2015). Adenovirus receptors: implications for tropism, treatment and targeting. *Reviews in Medical Virology*, 25(1), 2-23. <https://doi.org/10.1002/rmv>

Barnadas, C., Schmidt, D. J., Fischer, T. K., & Fonager, J. (2018). Molecular epidemiology of human adenovirus infections in Denmark, 2011-2016. *Journal of Clinical Virology*, 104(January), 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.04.012>

Bauer, U., Flunker, G., Bruss, K., Kallwellis, K., Liebermann, H., Luettich, T., ... Seidel, W. (2005). Detection of antibodies against adenovirus protein IX, fiber, and hexon in human sera by immunoblot assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4426-4433. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4426-4433.2005>

Berk, A.J. (2007) Adenoviridae: the viruses and their replication. in *Fields virology* (editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA)

Wold W.S.M. & Horwitz, M.S. (2007) Adenoviruses. In *Fields virology* (editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA)

Cappuccini, F., Stribbling, S., Pollock, E., Hill, A. V. S., & Redchenko, I. (2016). Immunogenicity and efficacy of the novel cancer vaccine based on simian adenovirus and MVA vectors alone and in combination with PD-1 mAb in a mouse model of prostate cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 65(6), 701-713. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1831-8>

Cervera-Carrascon, V., Siurala, M., Santos, J. M., Havunen, R., Tähtinen, S., Karell, P., ... Hemminki, A. (2018). TNFα and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade. *Oncolmmunology*, 7(5), 1-11. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1412902>

Cheng, T., Song, Y., Zhang, Y., Zhang, C., Yin, J., Chi, Y., & Zhou, D. (2017). A novel oncolytic adenovirus based on simian adenovirus. *8(16)*, 26871-26885.

Engeland, C. E., Grossardt, C., Veinalde, R., Bossow, S., Lutz, D., Kaufmann, J. K., ... Ungerechts, G. (2014). CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Molecular Therapy*, 22(11), 1949-1959. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.160>

Filley, A. C., & Dey, M. (2017). Immune System, Friend or Foe of Oncolytic Virotherapy? *Frontiers in Oncology*, 7(May), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00106>

Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., & Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nature Medicine*, 9(11), 1408-1412. <https://doi.org/10.1038/nm952>

Grekova, S. P., Raykov, Z., Zawatzky, R., Rommelaere, J., & Koch, U. (2012). Activation of a glioma-specific immune response by oncolytic parvovirus Minute Virus of Mice infection. *Cancer Gene Therapy*, 19(7), 468-475. <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.20>

Grossardt, C., Engeland, C. E., Bossow, S., Halama, N., Zaoui, K., Leber, M. F., ... Ungerechts, G. (2013). Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Armed Oncolytic Measles Virus Is an Effective Therapeutic Cancer Vaccine. *Human Gene Therapy*, 24(7), 644-654. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.205>

Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D. D., & Kirn, D. H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Medicine*, (44), 398-399. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/110002916101/>

- Hoppe, E., Pauly, M., Gillespie, T. R., Akoua-Koffi, C., Hohmann, G., Fruth, B., ... Calvignac-Spencer, S. (2015). Multiple cross-species transmission events of human adenoviruses (HAdV) during hominine evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 2072-2084. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv090>
- 5 Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(9), 642-662. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>
- Kleijn, A., Kloezevan, J., Treffers-Westerlaken, E., Fulci, G., Leenstra, S., Dirven, C., ... Lamfers, M. (2014). The in vivo therapeutic efficacy of the oncolytic adenovirus Delta24-RGD is mediated by tumor-specific immunity. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097495>
- 10 Larson, C., Oronsky, B., Scicinski, J., Fanger, G. R., Stirn, M., Oronsky, A., & Reid, T. R. (2015). Going viral: a review of replication-selective oncolytic adenoviruses. *Oncotarget*, 6(24). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5116>
- Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 441-462. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>
- 15 Lynch, J. P., & Kajon, A. E. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), 586-602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>
- Madisch, I., Hofmayer, S., Moritz, C., Grintzalis, A., Hainmueller, J., Pring-Akerblom, P., & Heim, A. (2007). Phylogenetic Analysis and Structural Predictions of Human Adenovirus Penton Proteins as a Basis for Tissue-Specific Adenovirus Vector Design. *Journal of Virology*, 81(15), 8270-8281. <https://doi.org/10.1128/jvi.00048-07>
- 20 Martin, N. T., Roy, D. G., Workenhe, S. T., Den, D. J. M. Van, Hoeben, R. C., Mossman, K. L., & Bell, J. C. (2019). Pre-surgical neoadjuvant oncolytic virotherapy confers protection against rechallenge in a murine model of breast cancer. *Scientific Reports*, (October 2018), 3-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38385-7>
- Mostafa, A. A., Meyers, D. E., Thirukkumaran, C. M., Liu, P. J., Gratton, K., Spurrell, J., ... Morris, D. G. (2018). Oncolytic reovirus and immune checkpoint inhibition as a novel immunotherapeutic strategy for breast cancer. *Cancers*, 10(6), 1-18. <https://doi.org/10.3390/cancers10060205>
- 25 Pantó, L., Podgorski, I. I., Jánoska, M., Márkó, O., & Harrach, B. (2015). Taxonomy proposal for Old World monkey adenoviruses: characterisation of several non-human, non-ape primate adenovirus lineages. *Archives of Virology*, 160(12), 3165-3177. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2575-z>
- 30 Raja, J., Ludwig, J. M., Gettinger, S. N., Schalper, K. A., & Kim, H. S. (2018). Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 6(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0458-z>
- Roy, S., Vandenberghe, L. H., Kryazhimskiy, S., Grant, R., Calcedo, R., Keough, M., ... Wilson, J. M. (2009). Isolation and Characterization of Adenoviruses Persistently Shed from the Gastrointestinal Tract of Non-Human Primates. 5(7), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000503>
- 35 Shashkova, E. V., May, S. M., & Barry, and M. A. (2010). Characterization of human adenovirus serotypes 5, 6, 11, and 35 as anticancer agents. 46(2), 220-231. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.025>
- Short, J. J., Vasu, C., Holterman, M. J., Curiel, D. T., & Pereboev, A. (2006). Members of adenovirus species B utilize CD80 and CD86 as cellular attachment receptors. *Virus Research*, 122(1-2), 144-153. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.07.009>
- 40 Shtrichman, R., & Kleinberger, T. (1998). Adenovirus Type 5 E4 Open Reading Frame 4 Protein Induces Apoptosis in Transformed Cells Adenovirus Type 5 E4 Open Reading Frame 4 Protein Induces Apoptosis in Transformed Cells. *Journal of Virology*, 72(4), 2975.
- Vogels, R., Zuijdgheest, D., van Rijnsoever, R., Hartkoorn, E., Damen, I., de Bethune, M.-P., ... Havenga, M. (2003). Replication-Deficient Human Adenovirus Type 35 Vectors for Gene Transfer and Vaccination: Efficient Human Cell Infection and Bypass of Preexisting Adenovirus Immunity. *Journal of Virology*, 77(15), 8263-8271. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.15.8263-8271.2003>
- 45 Wang, H., Li, Z., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Möller, T., ... Lieber, A. (2011). Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11, and 14. *Nature Medicine*, 17(1), 96-104. <https://doi.org/10.1038/nm.2270>
- 50 Zhang, Y., & Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus Receptors. 79(19), 12125-12131. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12125>

Zhao, H., Xu, C., Luo, X., Wei, F., Wang, N., Shi, H., & Ren, X. (2018). Seroprevalence of neutralizing antibodies against human adenovirus type-5 and chimpanzee adenovirus type-68 in cancer patients. *Frontiers in Immunology*, 9(MAR), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00335>

5 Thomas MA, Spencer JF, Toth K, Sagartz JE, Phillips N, Wold WSM. Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and anti tumor efficacy in the Syrian hamster model. *Mol Ther*. 2008; 16:1665-1673

Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM, Spaan WJM (2003). A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol*, 84, 1261-1268. doi:10.1099/vir.0.18860-0.

10 Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids (1983). *J Mol Biol*, 166(4), 557-580. doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8

Kong Y, Yang T, Geller AI (1999). An efficient in vivo recombination cloning procedure for modifying and combining HSV-1 cosmids. *J Virol Methods*, 80(2), 129-136. doi:10.1016/s0166-0934(99)00033-6

15 Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, et al. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 7(2):215-222. doi:10.1089/hum.1996.7.2-215

Stolarek, R., Gomez-Manzano, C., Jiang, H. et al. (2004). Robust infectivity and replication of Delta-24 adenovirus induce cell death in human medulloblastoma. *Cancer Gene Ther*, 11, 713-720. doi.org/10.1038/sj.cgt.7700731

20 Garcia-Nafria, J., Watson, J.F., & Greger, I.H. (2016). Iva Cloning: A Single-Tube Universal Cloning System Exploiting Bacterial in Vivo Assembly. *Sci Rep*, 6, 27459. doi.org/10.1038/srep27459

Whyte, P., Ruley, H. E., and Harlow, E (1988). Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.*62, 257-265.

Whyte,P., Williamson, N.M., Harlow, E. (1989) Cellular Targets for Transformation by the Adenovirus E1A Proteins. *Cell* 56:67-75.

25 Tabla 13: Tabla de concordancia de SEQ ID NO para NHP 007, NHP 012 y NHP 006

	SEQ ID NOs PARA NHP 007 (también conocido como adenovirus de simio AH34 en el presente documento) - aislado de gorila	SEQ ID NOs PARA NHP 012 (también conocido como adenovirus de simio BZ34 en el presente documento) - aislado de Bonobo	SEQ ID NOs PARA NHP 006 (también conocido como adenovirus de simio AH29 en el presente documento) - aislado de gorila
Virus de longitud completa de nucleótido	1	36	71
Proteína E3 CR1-beta	2	47	N/A
Proteína 100K	3	37	73
Proteína 22K	4	38	74
Proteína 33K	5	39	75
Proteína 52K	6	40	76
Proteína DBP	7	41	77
Proteína E1B 19K	8	42	78
Proteína E1B 55K	9	43	79
Proteína E3 12.5 K	10	44	80
Proteína E3 14.7 K	11	45	81

ES 3 018 628 T3

Proteína E3 CR1-alfa	12	46	82
Proteína E3 CR1-gamma	13	48	83
Proteína E3 gp19K	14	49	84
Proteína E4 ORF1	15	52	85
Proteína E3 RID-alfa	16	50	86
Proteína E3 RID-beta	17	69	87
Proteína E4 34K/ E4ORF6	18	51	88
Proteína E4 ORF2	19	53	89
Proteína E4 ORF3	20	54	90
Proteína E4 ORF4	21	55	91
Proteína fibra	22	56	92
Proteína hexón	23	57	93
Proteína IVa2	24	58	94
Proteína IX	25	59	95
Proteína base de pentón	26	60	96
Proteína pIIIa	27	61	97
Proteína pol	28	62	98
Proteína proteasa	29	63	99
Proteína pTP	30	64	100
Proteína pVI	31	65	101
Proteína pVII	32	66	102
Proteína pVIII	33	67	103
Proteína pX	34	68	104
Proteína V	35	70	105
Proteína E1A 13S	211	213	210
Proteína E3 6.6 kDa			214

Tabla 14: Tabla de concordancia de SEQ ID NO para NHP 002, NHP 005 y NHP 008

	SEQ ID NOs PARA NHP 002 (también conocido como adenovirus de simio AH6 en el presente documento) - aislado de Bonobo	SEQ ID NOs PARA NHP 005 (también conocido como adenovirus de simio AH16 en el presente documento) - Aislado de Urangutan	SEQ ID NOs PARA NHP 008 (también conocido como adenovirus de simio AH35 en el presente documento) - aislado de gorila
--	--	--	---

ES 3 018 628 T3

Virus de longitud completa de nucleótido	106	142	176
Proteína 100K	107	143	177
Proteína proteína de 13.6 kD	108	144	178
Proteína 22K	109	145	179
Proteína 33K	110	146	180
Proteína 52K	111	147	181
Proteína DBP	112	148	182
Proteína E1B 19K	113	149	183
Proteína E1B 55K	114	150	184
Proteína E3 11.6 kD	115	N / A	N / A
Proteína E3 12.5 K	116	151	185
Proteína E3 14.7 K	117	152	186
Proteína E3 19kD	118	153	187
Proteína E3 CR1-alfa	119	154	N / A
Proteína E3 CR1-beta/gamma	120	N / A	N / A
Proteína E3 RID-alfa	121	155	189
Proteína E3- RID beta	122	156	190
Proteína E4 34K/ E4ORF6	123	157	191
Proteína E4 ORF1	124	158	192
Proteína E4 ORF3	125	159	193
Proteína E4 ORF4	126	160	194
ORFB de proteína E4	127	161	195
Proteína fibra	128	162	196

ES 3 018 628 T3

Proteína hexón	129	163	197
Proteína IVa2	130	164	198
Proteína IX	131	165	199
Proteína base de pentón	132	166	200
Proteína pIIIa	133	167	201
Proteína pol	134	168	202
Proteína proteasa	135	169	203
Proteína pTP	136	170	204
Proteína pV	137	171	205
Proteína pVI	138	172	206
Proteína pVII	139	173	207
Proteína pVIII	140	174	72
Proteína pX	141	175	188
Proteína E1A 13S	208	209	212
Proteína E4 ORF6			215
Proteína E4 ORF2			216

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de: SEQ ID NO: 57; o SEQ ID NO: 93.
2. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de fibra que comprende:
 - 5 (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos SEQ ID NO: 56; o
 - (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92; opcionalmenteen la que el polipéptido de fibra comprende la secuencia de aminoácidos de: residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92 además opcionalmente, en la que el polipéptido de fibra comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o 92.
3. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de base de pentón que comprende:
 - (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; o
 - 15 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 26.
4. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica:
 - (a) un polipéptido de hexón según la reivindicación 1 y:
 - (i) un polipéptido de fibra según la reivindicación 2;
 - (ii) un polipéptido de base de pentón según la reivindicación 3; o
 - 20 (iii) un polipéptido de fibra según la reivindicación 2 y un polipéptido de base de pentón según la reivindicación 3; o
 - (b) un polipéptido de base de pentón que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 y;
 - (i) un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 23 y/o
 - 25 (ii) un polipéptido de fibra que tiene al menos 95 % de identidad con al menos uno de: los residuos de aminoácidos 128 a 322 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 75 a 127 de SEQ ID NO: 22; residuos de aminoácidos 1 a 74 de SEQ ID NO: 22.
5. La secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 4(a), en la que el ácido nucleico codifica:
 - 30 (i) un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
 - (ii) un polipéptido de hexón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, y un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; o
 - 35 (iii) un polipéptido de hexón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.
6. La secuencia de ácido nucleico aislada según cualquier reivindicación anterior, en la que la secuencia se selecciona del grupo que consiste en:
 - (a) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 y su complemento;
 - 40 (b) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 36 y su complemento; y
 - (c) una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 71 y su complemento.
7. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según cualquier reivindicación anterior.
8. Un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Un adenovirus de primate no humano aislado que tiene una cápside que comprende un polipéptido de cápside de al menos uno de:
- (a) un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; o SEQ ID NO: 93;
- 5 (b) un polipéptido de fibra que comprende:
- (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; o
 - (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92;
- 10 (c) un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de al menos uno de: SEQ ID NO: 56; residuos de aminoácidos 127 a 320 de SEQ ID NO: 92; residuos de aminoácidos 74 a 126 de SEQ ID NO: 92; o residuos de aminoácidos 1 a 73 de SEQ ID NO: 92;
- (d) un polipéptido de fibra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o 92;
 - (e) un polipéptido de base de pentón que comprende:
- 15 (i) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; o
- (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO: 26; o
 - (f) un polipéptido de base de pentón que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 o 96; opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón de (a) y un polipéptido de fibra seleccionado de (b) a (d), y opcionalmente un polipéptido de base de pentón seleccionado de (e) a (f).
- 20 10. El adenovirus según la reivindicación 9, en el que:
- (i) el polipéptido de la cápside es un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26, opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22; y un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26; o
- 25 (ii) la proteína de la cápside se selecciona de un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, opcionalmente la cápside comprende un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; o
- 30 (iii) la proteína de la cápside se selecciona de un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92; y un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; opcionalmente en la que la cápside comprende un polipéptido de hexón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; y un polipéptido de fibra que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92; y opcionalmente un polipéptido de base de pentón que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96.
- 35
11. El adenovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que:
- 40 (i) el adenovirus es condicionalmente replicativo; y/o
- (ii) el adenovirus carece de:
 - (a) todo o una parte del gen E1; y/o
 - (b) todo o parte del gen E1A; opcionalmente en el que el E1A tiene una delección $\Delta 24$; y/o
 - (iii) el adenovirus comprende además los elementos cis del adenovirus del lado izquierdo y del lado derecho necesarios para la replicación y la encapsidación, opcionalmente en el que los elementos cis necesarios para la replicación y la encapsidación comprenden una repetición terminal invertida del lado izquierdo del adenovirus y una repetición terminal invertida del lado derecho del adenovirus, y señales de encapsidación.
- 45
12. Un genoma de adenovirus de primate no humano aislado que codifica el adenovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11.

13. Una composición farmacéutica que comprende un adenovirus, genoma, secuencia de ácido nucleico aislada, vector o proteína de cualquier reivindicación anterior, y un excipiente, adyuvante, diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable.

5 14. Una composición según la reivindicación 13 para su uso en la orientación de una célula que tiene un receptor adenoviral en un sujeto.

15. Una composición según la reivindicación 13 para su uso en terapia, opcionalmente en la que la composición es para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

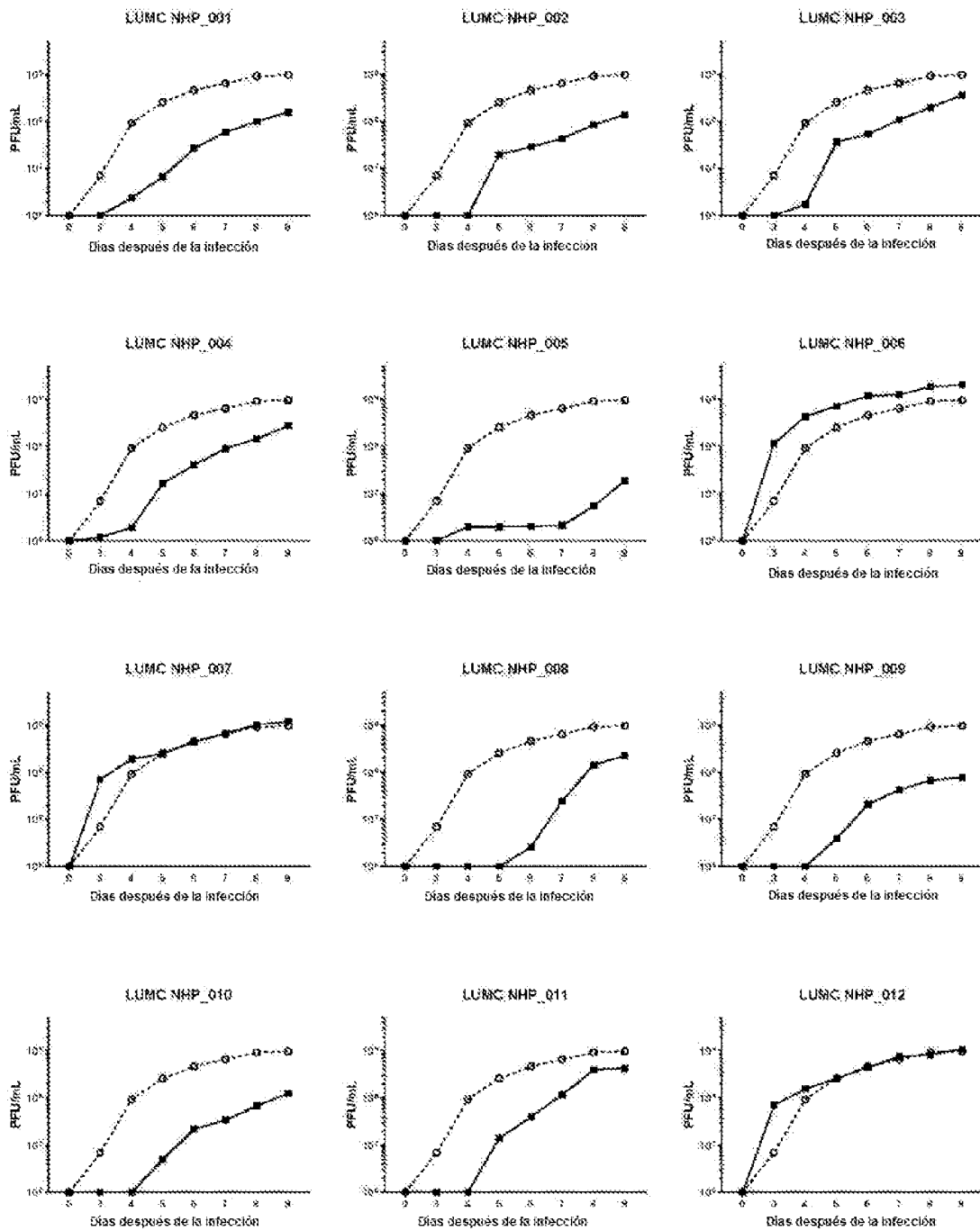


FIGURA 1

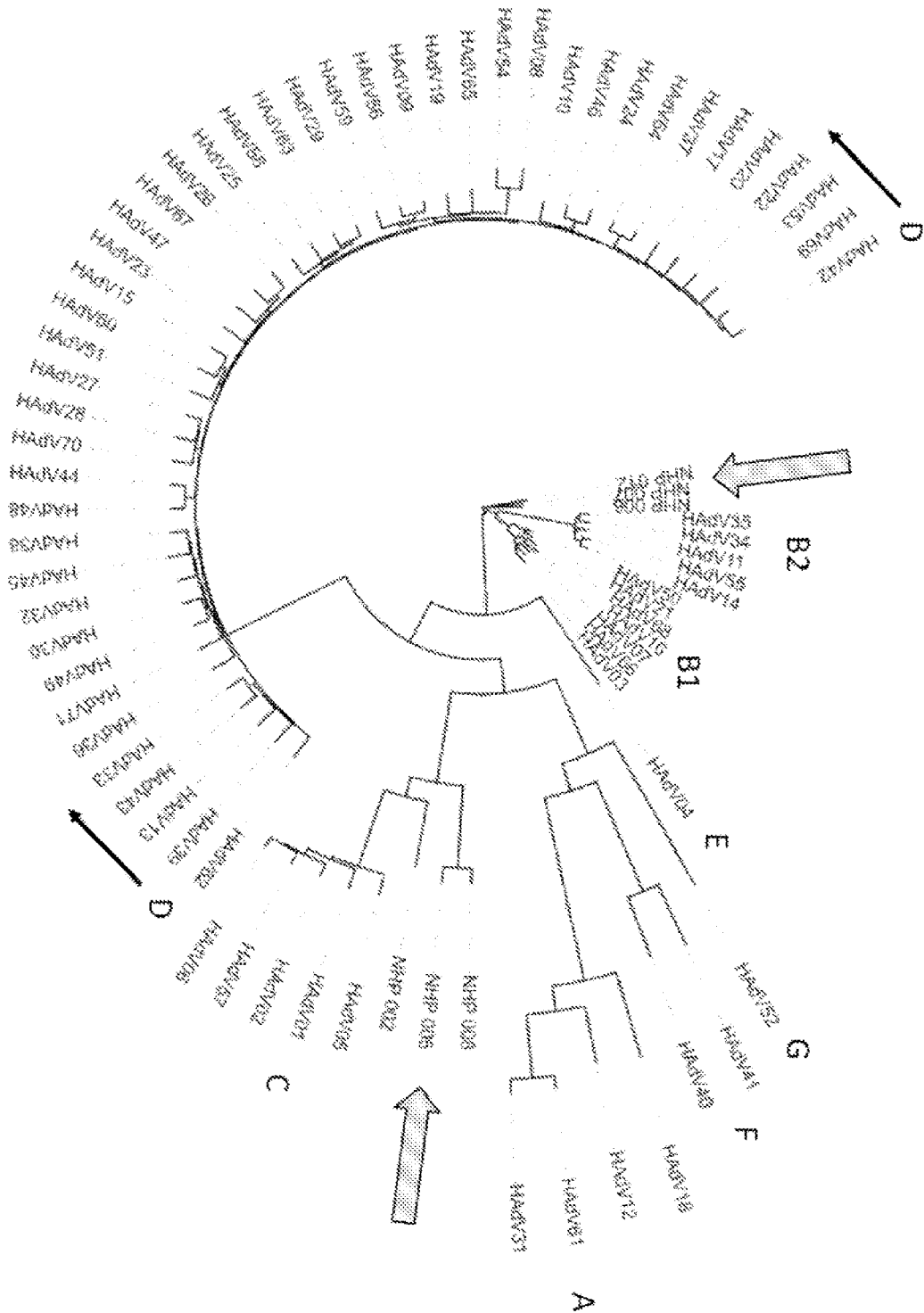
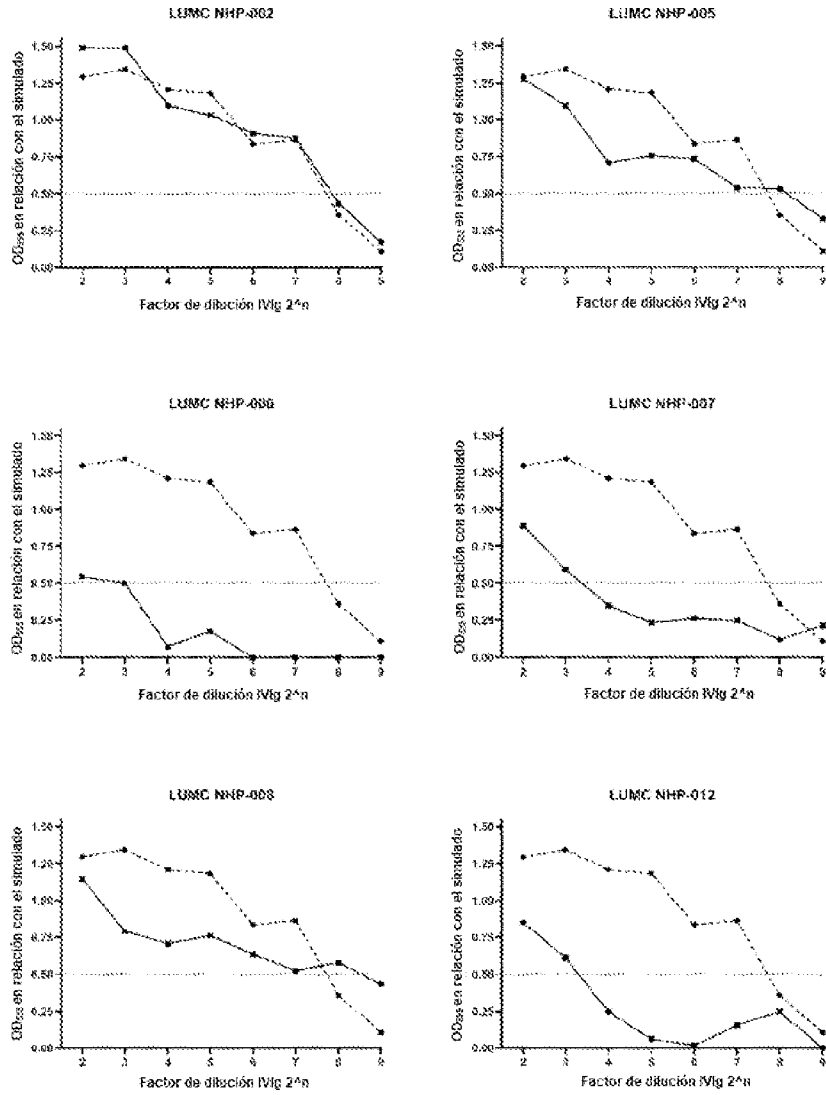


FIGURA 2



Virus	Subgrupo	IVig-dilución-50%
HAclV5	C	1/128 - 1/256
NHP-002	C	1/128 - 1/256
NHP-005	C	1/256 - 1/512
NHP-006	B	1/4 - 1/8
NHP-007	B	1/8 - 1/16
NHP-008	C	1/256 - 1/512
NHP-012	B	1/8 - 1/16

FIGURA 3

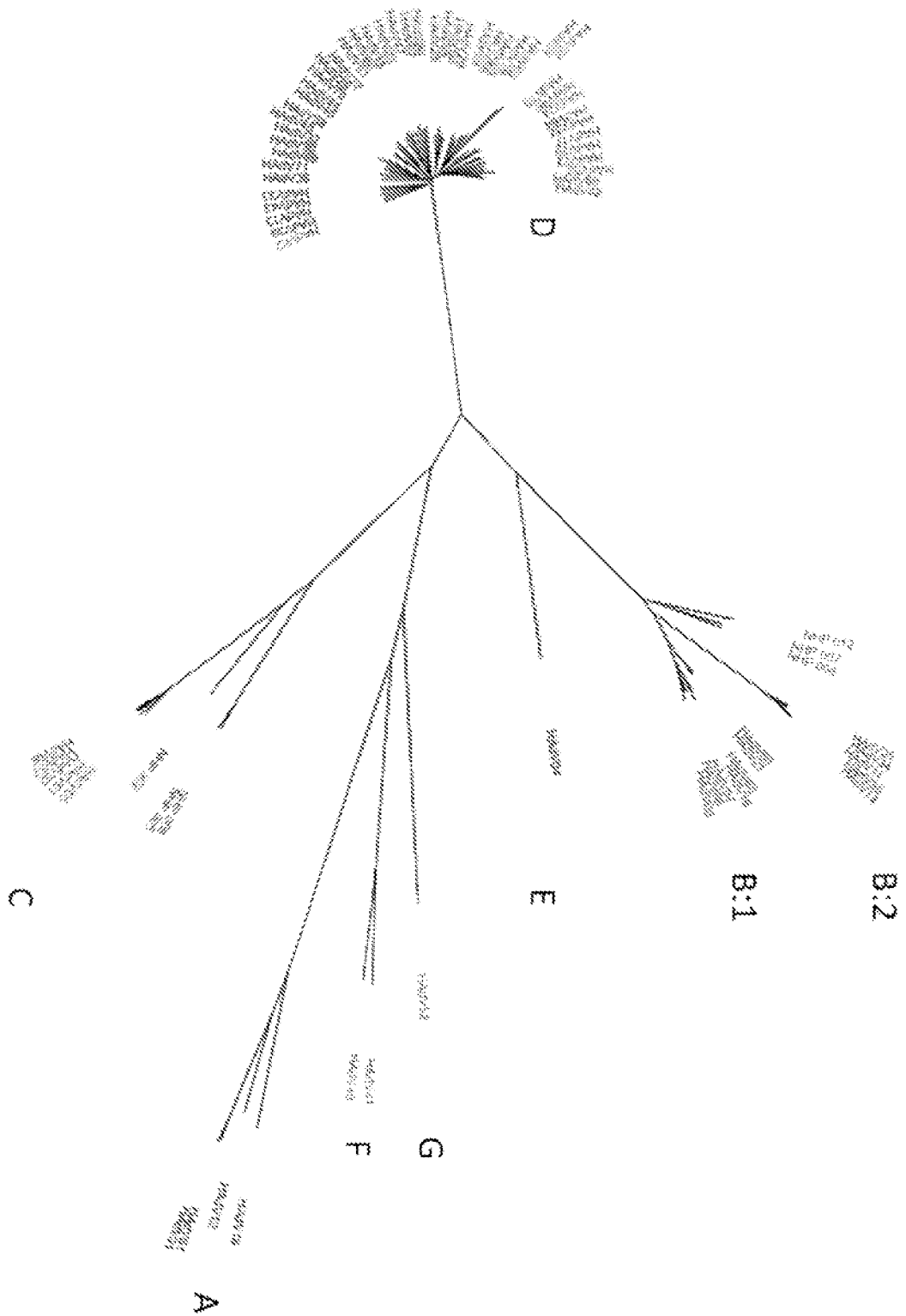


FIGURA 4

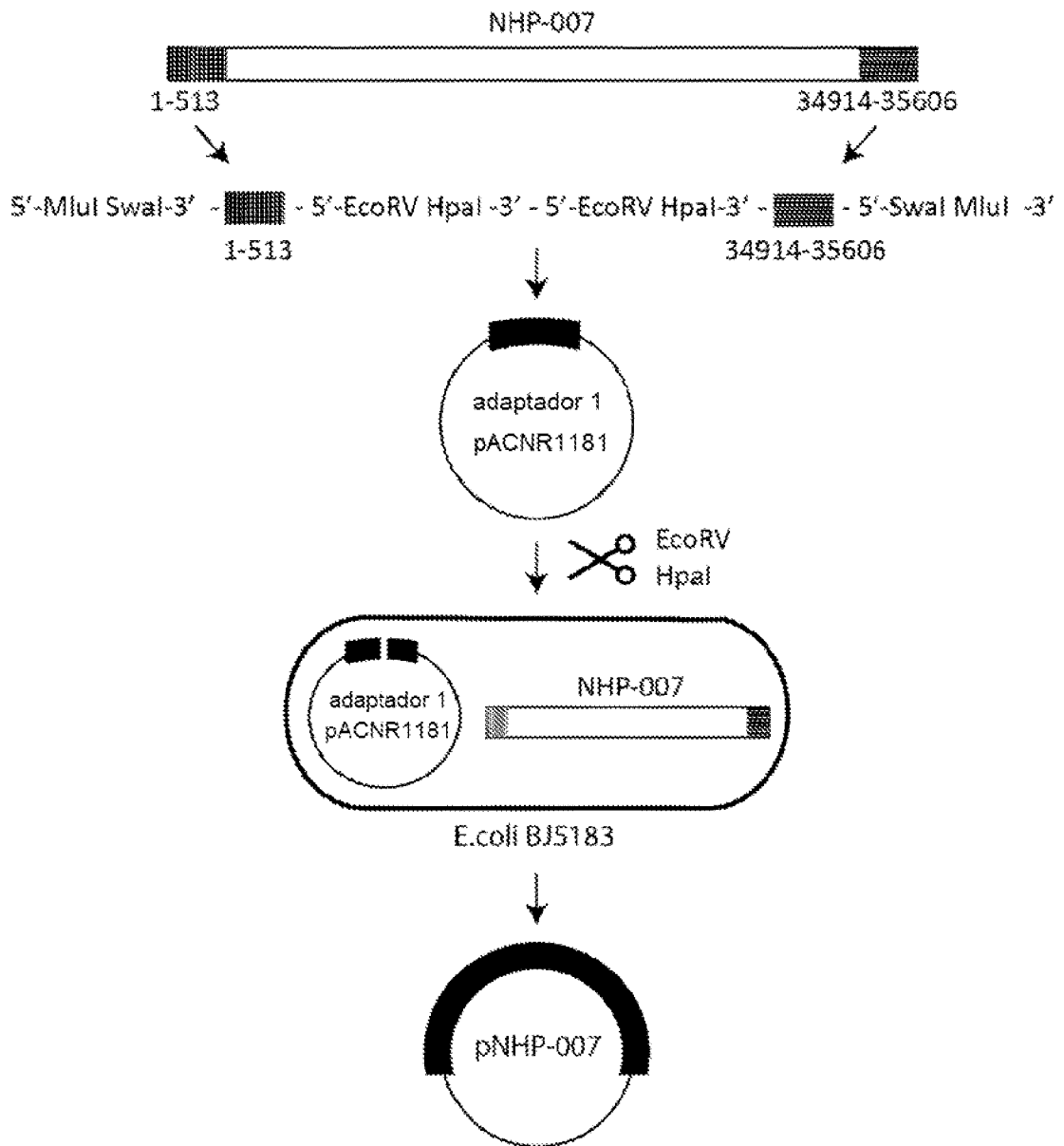


FIGURA 5

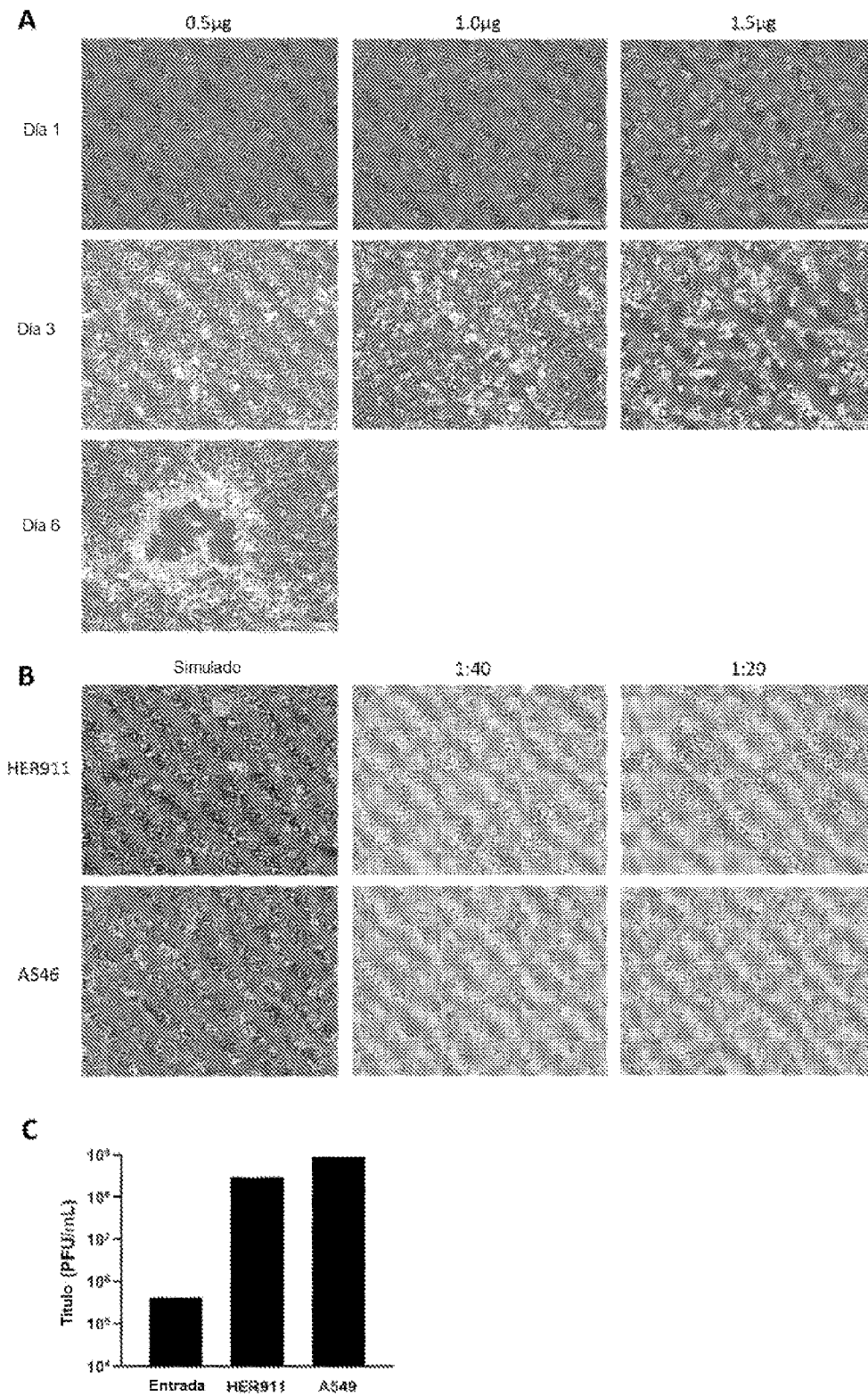


FIGURA 6