

# MIEMDNPI

DIRECCIÓN NACIONAL DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCION  MODELO DE UTILIDAD  DISEÑO INDUSTRIAL

29 APR 2010

FECHA DE PRESENTACION.....

**Nº DE ACTA**

32.592

**Nº DE PATENTE**

## SOLICITANTE

- UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
- GRIFOLS, S.A.
- FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I PUJOL
- FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS

CODIGO PAIS ES

## TITULO

MÉTODOS Y REACTIVOS PARA UNA TRANSFERENCIA GÉNICA EFICAZ Y DIRIGIDA A MONOCITOS Y MACRÓFAGOS

I.P.C.

## AGENTE

NOMBRE GUSTAVO FISCHER

CODIGO 94

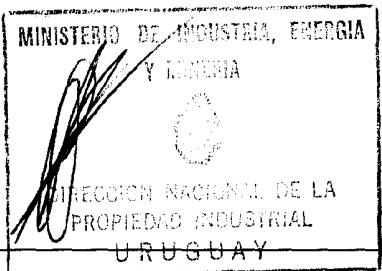
**MINISTERIO DE INDUSTRIA, ENERGIA Y MINERIA**

**ESPACIO RESERVADO PARA LA ADMINISTRACION**

FECHA DE SOLICITUD: 29 APR 2010 N° DE SOLICITUD:

FECHA DE RESOLUCION: \_\_\_\_\_ N° DE RESOLUCION:

FIRMA DEL FUNCIONARIO



**DATOS DEL SOLICITANTE**

**NOMBRE:**

- UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
- GRIFOLS, S.A.
- FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT GERMANS TRIAS I PUJOL
- FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS

**DOMICILIO:**

- Edifici A - Campus Universitari s/n, E-08193 Bellaterra - Barcelona
- Jesús y María, 6, E-08022 Barcelona
- Carretera de Can Ruti, Camí de les Escoles, s/n, E-08911 Badalona - Barcelona
- Passeig Lluís Companys, 23, 08010 Barcelona

PAIS: España

CODIGO: ES

TELEFONO: \_\_\_\_\_ CELULAR: \_\_\_\_\_

CORREO ELECTRONICO: \_\_\_\_\_

**NOMBRE DEL INVENTOR**

Miquel Àngel GASSULL DURO, Adolfo RIO FERNÁNDEZ, Ester FERNÁNDEZ GIMENO, Miguel CHILLÓN RODRÍGUEZ

PRIORIDAD

DIVISIONAL

PAIS

NUMERO

FECHA

EP

EP09159001.8

29/04/2009

DECLARO QUE LOS DATOS QUE ANTECEDEN CORRESPONDEN A LA REALIDAD AL DIA DE HOY

FIRMA

**MEMORIA DESCRIPTIVA**

de la

**PATENTE DE INVENCION**

Denominada

**MÉTODOS Y REACTIVOS PARA UNA TRANSFERENCIA  
GÉNICA EFICAZ Y DIRIGIDA A MONOCITOS Y  
MACRÓFAGOS**

que solicitan

- **UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**
- **GRIFOLS, S.A.**
- **FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA SALUT  
GERMANS TRIAS I PUJOL**
- **FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I  
ESTUDIS AVANÇATS**

**al amparo de la Ley N° 17.164 y el Convenio de Paris  
reivindicando prioridad de la solicitud de patente europea  
N° EP09159001.8 del 29 de abril de 2009.**

**MÉTODOS Y REACTIVOS PARA UNA TRANSFERENCIA GÉNICA EFICAZ Y DIRIGIDA A MONOCITOS Y MACRÓFAGOS**

**DESCRIPCIÓN**

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a la capacidad del adenovirus 5 humano quimérico que porta la fibra corta de Ad40 entérico para transferir material genético a monocitos y macrófagos en un procedimiento eficaz y selectivo, y a la optimización de la respuesta a la dosis y el perfil de bioseguridad en células transducidas.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 Las células mononucleares se han definido como un linaje de células hematopoyéticas derivadas de células progenitoras en la médula ósea. Las células progenitoras mieloides comprometidas se diferencian formando monocitos sanguíneos, que circulan en la sangre y luego entran en los tejidos convirtiéndose en macrófagos residentes. Durante muchos años se ha conocido y estudiado la existencia de subconjuntos de monocitos en seres humanos. Se identificaron monocitos humanos mediante la expresión de CD14. Pueden clasificarse además basándose en la expresión de CD16 (el receptor de Fc de alta afinidad). Las células CD16- se denominan monocitos *clásicos* dado que son habitualmente aproximadamente el 90% de los monocitos totales en individuos sanos. Las células CD16+ parecen expandirse en muchas enfermedades inflamatorias y presentan una migración preferente a través de las capas endoteliales en respuesta a quimiocinas. Por tanto, se denominan habitualmente monocitos *no clásicos* o *proinflamatorios*. Se ha demostrado que este subconjunto de monocitos puede diferenciarse en células dendríticas (CD). Se ha descrito un aumento considerable en el número de monocitos CD14+CD16+ para una variedad de infecciones sistémicas y localizadas.

Mientras que los monocitos son células ampliamente reclutables, la mayor parte de la capacidad migratoria de macrófagos derivados de monocitos y CD se suprime en el proceso de maduración debido a una pérdida progresiva de receptores de quimiocinas inflamatorias. A la inversa, la regulación por incremento de CCR7 durante el proceso de maduración de CD aumenta su respuesta migratoria hacia los vasos linfáticos y ganglios linfáticos de drenaje. (Eur. J. Immunol 1998. 28:2760-2769; J. Neuroimmunol 2008 197:21-28).

Por tanto, la manipulación genética de los monocitos sanguíneos es sumamente atractiva dado que puede permitir la manipulación de la respuesta inmunitaria en una ubicación particular en la que tiene lugar un proceso inflamatorio y a la que migrarán preferiblemente los monocitos bajo la influencia de factores quimiotácticos liberados por células dañadas en sitios inflamados.

Los monocitos se encuentran en la sangre humana en cantidades variables, oscilando desde el 5-10% de los leucocitos de sangre periférica totales en individuos sanos, aunque este número puede superarse enormemente siempre que esté presente un estado inflamatorio. Varían en tamaño y tienen diferentes grados de granularidad y una morfología nuclear variada. De hecho, los monocitos se reclutan preferiblemente en zonas inflamadas, en las que adquieren nuevos papeles y realizan funciones fagocíticas y de presentación de antígenos. En ciertas condiciones, pueden evolucionar a células dendríticas, que son células presentadoras de antígenos sumamente eficaces y que organizan la respuesta inmunitaria provocada frente a un ataque particular y dirigen la función de los linfocitos.

Los macrófagos son relativamente resistentes a la transfección, aunque hay varios informes que reivindican que pueden usarse finalmente vectores adenovirales como vectores para transfectar macrófagos derivados de monocitos, células dendríticas o incluso monocitos (Eur. J. Immunol. 1999, 29:

964-972; Blood 1998 91: 392-398; Acta Pharmacol. Sin. 2006, 27: 609-616; Biochem. Biophys. Res. Com. 1993, 195: 1174-1183; Gene Ther. 2000, 7: 263-270, Cytotherapy, 2006 8: 36-46; Mol. Ther. 2007, 16: 210-217 y J. Immunol. 2008, 181: 8018-8026).

5 Sin embargo, estos informes no usan monocitos no diferenciados y no estimulados dado que cultivan células en presencia de diferentes combinaciones de citocinas y factores tales como factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), también conocido como factor 1 estimulante de colonias (CSF-1), factor

10 estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y otros. En contacto con los monocitos, M-CSF potencia la expresión de antígenos de diferenciación, aumenta las actividades quimiotácticas y fagocíticas y estimula la producción de varias citocinas (Ross J. A. y Auger M. J. en

15 The Macrophage, segunda edición; Oxford University Press, 2002; Pathol. Int. 2008, 58: 143-155). Además, se ha demostrado que pueden generarse CD humanas a partir de monocitos en presencia de GM-CSF solo (Immunobiology 2008, 213: 859-870). En cambio, los monocitos se consideran

20 esencialmente como células no transfectables (Gene Ther. 1997, 4: 524-532; J. Immunol. Methods 2008, 330: 86-95). De ese modo, los intentos hasta la fecha de transfectar selectivamente monocitos no diferenciados y no estimulados de sangre periférica usando o bien electroporación o bien métodos

25 virales y no virales no han tenido éxito (Gastroenterology 2006 131:1799-181). Notablemente, el uso reciente de vectores de Ad5 quimérico que portan fibras de Ad35 y Ad11 ha permitido la infección de diferentes células sanguíneas primarias incluyendo células T, células B y monocitos (Virology 2006,

30 25: 349(1): 96-111). Además, Herold et al., (Langenback's Archives of Surgery, 2006, 391:72-82) han notificado también el uso de adenovirus para transfectar monocitos, Gerstzen et al., (J. Biol. Chem. 2001, 276: 26846-26851) y Kaan-Shanzer et al., 2001, Hum. Gene Therapy, 12:1989-2005) han notificado que

35 los adenovirus pueden usarse para transducir monocitos de

sangre del cordón umbilical. Mayne *et al* (J. Immunol. Methods, 2003, 278: 45-56) han descrito que la eficacia de la transfección de células CD14+ con adenovirus puede mejorarse si la células se centrifugan en presencia de adenovirus antes de la etapa de transducción.

La solicitud de patente internacional WO9850053 describe métodos para transducir monocitos usando vectores adenovirales quiméricos que usan adenovirus Ad5 recombinante que comprende la proteína de fibra de Ad3. Este método permite una eficacia de transducción del 80% (a 100 partículas infectivas/células) o del 100% (a 1000 100 partículas infectivas/célula).

Sin embargo, ninguno de estos vectores es particularmente eficaz para su uso *in vivo* dado que pueden transducir otros tipos de células dando como resultado por tanto efectos secundarios debidos a la infección de células no diana. Por tanto, se necesitan en la técnica métodos y reactivos que permitan la transducción selectiva y eficaz de monocitos de sangre periférica no comprometidos, no estimulados y no diferenciados.

#### **SUMARIO DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un nanotransportador que comprende al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo con la condición de que el nanotransportador no sea una partícula adenoviral.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para suministrar un compuesto de interés a una célula del linaje de monocitos-macrófagos que comprende poner en contacto dicha célula con un nanotransportador que porta dicho compuesto de interés y en el que el transportador contiene al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en medicina.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 muestra el porcentaje de infección de vectores de adenovirus 5 humano y adenovirus 5/40 quimérico en la línea celular de monocitos murinos RAW 264.7.

La figura 2 muestra el porcentaje de infección de vectores de adenovirus 5 humano y adenovirus 5/40 quimérico en las líneas celulares de monocitos humanos THP-1 (alta infectividad) y U-937 (baja infectividad).

La figura 3 muestra las proporciones de las diferentes poblaciones de células sanguíneas en controles humanos. Los linfocitos T son la población principal (representando el 87% del total). Los monocitos representan sólo el 8% de las células mononucleares totales en la sangre.

La figura 4 muestra el porcentaje de infección de vectores de adenovirus 5 humano y adenovirus 5/40 quimérico en las diferentes poblaciones de células sanguíneas. Las poblaciones de células se identificaron mediante marcadores específicos de membrana usando análisis de fluorescencia (FACS): CD3+ (linfocitos T), CD19 + (linfocitos B), CD56+ / CD16+ / CD3- (células NK), CD14+ (monocitos).

La figura 5 muestra cómo los monocitos proinflamatorios (CD14+/CD16+) y los monocitos clásicos (CD14+ / CD16-) se infectan igualmente mediante vectores adenovirales.



La figura 6 muestra cómo el adenovirus 5/40 quimérico permite una expresión transgénica superior de GFP que la del adenovirus 5, en monocitos o bien (CD14+/CD16-) o bien (CD14+/CD16+).

5 La figura 7 muestra cómo el adenovirus 5/40 quimérico permite una expresión transgénica de GFP mayor con respecto al adenovirus 5, en monocitos o bien (CD14+/CD16-) o bien (CD14+/CD16+). Ad5: línea continua. Ad5/40: línea discontinua.

10 La figura 8 muestra el porcentaje de infección de monocitos (CD14+) a diferentes dosis de partículas virales por célula. Ad5/40: línea continua. Ad5: línea discontinua.

La figura 9 muestra la viabilidad de monocitos (CD14+) dependiendo de la dosis de adenovirus Ad5 y Ad5/40 usada. Ad5/40: línea continua. Ad5: línea discontinua.

15 La figura 10 muestra la viabilidad de monocitos (CD14+) que expresan el transgén GFP dependiendo de la dosis de adenovirus Ad5 y Ad5/40 usada. Ad5/40: línea continua. Ad5: línea discontinua.

## 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, los monocitos no diferenciados y no estimulados, una línea celular que se pensaba hasta la fecha que era resistente a la transfección, podían de hecho  
25 transfectarse usando vectores de adenovirus 5 humano quimérico que portaban la fibra corta de Ad40 entérico. De hecho, tal como se muestra en los ejemplos 1 a 3 de la presente invención, un adenovirus Ad5 recombinante que comprende la proteína de fibra corta de Ad40 puede transfectar monocitos de  
30 ratón de la mucosa intestinal, macrófagos humanos derivados de monocitos y monocitos de sangre periférica no diferenciados y no estimulados. La capacidad del adenovirus quimérico Ad5/40 para transferir materiales genéticos a monocitos parece depender de la presencia dentro del virus de la fibra corta de  
35 Ad40, tal como se muestra mediante el hecho de que los Ad5 que

portan su propia proteína de fibra son mucho menos eficaces en la transfección de monocitos (véase el ejemplo 5 de la invención). Este hallazgo abre la puerta al desarrollo de reactivos de transfección sumamente específicos que portan la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F.

#### A. NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCION

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un nanotransportador que comprende al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término "nanotransportador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un complejo de múltiples componentes con dimensiones controladas, por ejemplo, un diámetro o radio del orden de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nanómetros que contiene un compuesto de interés. Los nanotransportadores preferidos para su uso en la presente invención incluyen virus, partículas similares a virus (VLP), nanopartículas, armazones proteicos y similares. En el caso de que el nanotransportador sea un virus, entonces el virus es preferiblemente un virus diferente de un adenovirus del subgrupo F.

##### a. Nanotransportadores virales

En una realización, el nanotransportador de la invención es un virus. El experto apreciará que puede usarse como nanotransportador en la presente invención cualquier virus conocido en la técnica siempre que esté disponible suficiente información de modo que se permita la modificación de los componentes externos mediante la proteína de fibra corta de un adenovirus de subgrupo. Por tanto, en el caso de virus no envueltos, los nanotransportadores de la invención se obtienen modificando directamente al menos una de las proteínas de la cápsida, o bien mediante acoplamiento químico de la proteína de fibra corta o bien insertando la secuencia que codifica

para la proteína de fibra corta en el gen viral que codifica para la proteína de la cápsida de modo que, tras la síntesis y el ensamblaje para dar la cápsida, la proteína de fibra corta se expone en la superficie externa de la cápsida. Los ejemplos de cápsidas de virus adecuadas que pueden modificarse de la anterior manera incluyen, pero no se limitan a, cápsidas de sindbis y otros alfavirus, rabdovirus (por ejemplo virus de la estomatitis vesicular), picornavirus (por ejemplo, rinovirus humano, virus Aichi), togavirus (por ejemplo, virus de la rubéola), ortomixovirus (por ejemplo, virus Thogoto, virus Batken, virus de la gripe aviar), poliomavirus (por ejemplo, poliomavirus BK, poliomavirus JC, poliomavirus aviar BFDV), parvovirus, rotavirus, bacteriófago Q $\beta$ , bacteriófago P1, bacteriófago M13, bacteriófago MS2, bacteriófago G4, bacteriófago P2, bacteriófago P4, bacteriófago 186, bacteriófago  $\Phi$ 6, bacteriófago  $\Phi$ 29, bacteriófago MS2, bacteriófago N4, bacteriófago  $\Phi$ X174, bacteriófago AP205, virus Norwalk, virus de la fiebre aftosa, un retrovirus, virus de la hepatitis B, virus del mosaico del tabaco (VMT), virus del mosaico del *Panicum satellite* (VMPS), virus del escarabajo neozelandés (virus flock house) y papilomavirus humano.

Alternativamente, cuando el nanotransportador es un virus envuelto, la proteína de fibra corta está unida preferiblemente a o reemplazando una parte de las glicoproteínas de la envuelta. Algunos ejemplos no limitativos de las glicoproteínas de superficie que pueden usarse para insertar la proteína de fibra corta incluyen glicoproteínas de alfavirus, tales como el virus del bosque de Semliki (VBS), virus del río Ross (VRR) y virus Aura (VA), que comprenden glicoproteínas de superficie tales como E1, E2 y E3. Las glicoproteínas E2 derivadas del virus Sindbis (SIN) y la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe son glicoproteínas no retrovirales que se unen específicamente a moléculas particulares sobre superficies celulares (glicosaminoglucano

heparán sulfato para E2, ácido siálico para HA) que se sabe que toleran ciertas modificaciones genéticas y permanecen ensambladas de manera eficaz sobre la superficie retroviral (Morizono et al. J. Virol. 75, 8016-8020); se usan  
5 glicoproteínas del virus de la fiebre de Lassa, virus de la hepatitis B, virus de la rabia, virus de la enfermedad de Borna, virus Hantaan o SARS-CoV; glicoproteínas de superficie basadas en flavivirus, hemaglutinina (HA) de la gripe A/virus de la gripe aviar/Rostock/34 (FPV), un fusógeno de clase I (T. Hatziioannou, S. Valsesia-Wittmann, S. J. Russell, F. L. Cosset, J. Virol. 72, 5313 (1998)). Virus adecuados para su uso en la presente invención comprenden alfavirus,  
10 paramixovirus, rabdovirus, coronavirus, picornavirus, mixovirus, reovirus, bunyavirus, flavivirus, rubivirus, filovirus, arenavirus, arterivirus o calicivirus.

Los virus adecuados que pueden modificarse mediante la inserción de la proteína de fibra corta de adenovirus del subgrupo F incluyen retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, virus ARN de  
20 cadena negativa tales como ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y la estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo virus del sarampión y Sendai), virus ARN de cadena positiva tales como picornavirus y alfavirus, y virus ADN bicatenario incluyendo  
25 adenovirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple tipos 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), y poxvirus (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar y viruela del canario). Otros virus incluyen, por ejemplo, virus Norwalk, togavirus, flavivirus, reovirus, papovavirus, hepadnavirus y  
30 virus de la hepatitis. Los ejemplos de retrovirus incluyen virus de sarcoma-leucosis aviar (por ejemplo, virus de la leucosis aviar, virus del sarcoma aviar), retrovirus tipo C, tipo B, tipo D de mamífero, virus HTLV-BLV, lentivirus, espumavirus (Coffin, J. M., "Retroviridae: The viruses and  
35 their replication", en Fundamental Virology, tercera edición,

editado por B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, *et al.* Lippincott-Raven Filadelfia, Pa. (1996)). Otros ejemplos incluyen virus de la leucemia murina, virus del sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia felina, virus del sarcoma felino, virus de la leucemia aviar, virus de la leucemia de células T humana, virus endógeno de babuinos, virus de la leucemia del gibón, virus Mason-Pfizer del mono, virus de la inmunodeficiencia del simio, virus del sarcoma del simio, virus del sarcoma de Rous y lentivirus.

Los retrovirus contienen dos subunidades de glicoproteína de la envuelta (designadas de superficie o SU y transmembrana o TM) que forman un complejo oligomérico en la superficie viral y median la entrada viral. La proteína SU contiene el receptor viral que se une a determinantes mientras que la proteína TM contiene una región transmembrana hidrófoba y un segmento hidrófobo separado que media la fusión virus-membrana celular (Weiss, R. A., "Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry," págs. 1-107, en J. A. Levy (ed.), *The Retroviridae*, vol. 2., Plenum Press: Nueva York, N.Y. (1993)). La primera etapa de la infección es la unión de la partícula viral a través de la proteína de superficie de la envuelta del retrovirus, proteína (env), y la fusión de la membrana viral y celular para lograr la captación viral a través de la proteína transmembrana de la proteína env. La proteína env es en gran medida responsable de la especificidad (entre tipos de células y entre especies) de la infectividad de los vectores retrovirales. Si se usan retrovirus como nanotransportadores según la presente invención, la proteína de fibra corta adenoviral del subgrupo F puede insertarse en cualquier subunidad de la glicoproteína de la envuelta o en la glicoproteína env.

Los virus adenoasociados (VAA) tienen un genoma de ADN monocatenario lineal y su receptor no se ha descrito todavía. Estos virus experimentan sólo una infección productiva si las

células infectadas se infectan conjuntamente con un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus), de lo contrario el genoma se integra en un estado latente en un sitio específico en un cromosoma humano (Linden, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11288-11294 (1996); y Bems, K. J., "Parvoviridae: The viruses and their replication" en Fields Virology, tercera edición, editado por B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers: Filadelfia, Pa. (1996)). Se preparan normalmente virus adenoasociados recombinantes reemplazando genes virales por genes de interés deseados o simplemente añadiendo las secuencias de ADN de VAA terminales (ITR) a estos genes.

Alternativamente, los nanotransportadores de la presente invención pueden basarse en virus ARN de cadena negativa. Estos virus pueden infectar células mediante una variedad de diferentes mecanismos. Por ejemplo, los virus de la gripe A tienen un genoma de ARN segmentado, contienen una proteína hemaglutinina de superficie que se une a receptores de ácido siálico de la superficie celular y media la entrada viral en un endosoma de pH bajo tras la endocitosis mediada por receptor. La invención contempla la modificación de la HA de superficie mediante la inserción de la proteína de fibra corta adenoviral.

Los paramixovirus que tienen un genoma de ARN no segmentado tienen dos proteínas virales de superficie, la hemaglutinina (HN) y una proteína de fusión (F), requeridas para la entrada viral que se produce a pH neutro. Estos virus pueden utilizar receptores de ácido siálico, o receptores de proteína (por ejemplo, CD46 usado por el virus del sarampión), para la entrada viral. La proteína de fibra corta adenoviral puede insertarse o unirse o bien a la hemaglutinina (HN) o bien a la proteína de fusión (F).

Los rabdovirus (por ejemplo, VSV) que tienen un genoma de ARN no segmentado, contienen una proteína de superficie (G) que se une a receptores específicos de la superficie celular y

media la entrada viral en un endosoma de pH bajo. Un fosfolípido específico parece ser uno de los receptores para VSV. La proteína de fibra corta adenoviral puede insertarse o unirse a la proteína G.

5           En otra realización, los nanotransportadores de la invención pueden basarse en virus ARN de cadena positiva. Estos virus infectan células mediante diferentes mecanismos. Por ejemplo, entre los picornavirus, se usan diferentes miembros de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas como  
10           receptores celulares por poliovirus, por los subgrupos principales de los rinovirus y por virus coxsackie B, mientras que se usa una proteína integrina por algunos tipos de ecovirus y se usa un receptor de lipoproteína de baja densidad por subgrupos minoritarios de rinovirus. Tras la  
15           unión al receptor, no se sabe todavía de manera precisa qué papel desempeña la endocitosis mediada por receptor para la entrada del picornavirus, si se requiere de hecho. Debido a que los picornavirus carecen de una bicapa lipídica de superficie, su ruta de entrada no implica la fusión de una  
20           membrana viral con una membrana celular huésped. Por tanto, si los picornavirus van a usarse como nanotransportadores, la proteína de fibra corta adenoviral debe unirse o acoplarse a una proteína de la cápsida tal como las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4.

25           En cambio, los alfavirus (por ejemplo, virus Sindbis y virus Semliki) sí contienen una bicapa lipídica de superficie. Estos virus contienen dos proteínas de superficie (E1 y E2), y en algunos casos una tercera proteína de superficie (E3) importante para la entrada viral. Estos virus usan diversos  
30           receptores de la superficie celular. Por ejemplo, el virus Sindbis puede usar un receptor de laminina u otros receptores y generalmente entra en las células mediante un mecanismo dependiente del pH, tras la endocitosis mediada por receptor. Por tanto, los nanotransportadores según la invención basados  
35           en alfavirus pueden contener la proteína de fibra corta

adenoviral unida o insertada dentro de las proteínas de superficie E1 y/o E2.

5 Otra posibilidad es el uso de herpesvirus como nanotransportadores según la presente invención. Los herpesvirus tienen genomas de ADN bicatenario grandes que contienen varias glicoproteínas de superficie implicadas en la entrada viral y utilizan diversos receptores de la superficie celular. Por ejemplo, la entrada del virus del herpes simple y el citomegalovirus implica la unión a un receptor de la superficie celular de heparán sulfato y los virus del herpes simple usan otras proteínas (por ejemplo, HVEM) para la entrada viral. En cambio, la entrada del virus de Epstein-Barr se inicia mediante la unión a un receptor de la superficie celular completamente distinto, CR2 (Wolf, Intervirology 10 35:26-39 (1993)). Se han descrito estrategias que permiten diseñar virus del herpes simple, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr como vectores para la expresión génica heteróloga.

20 En otra realización, la invención contempla el uso de poxvirus como nanotransportadores. Los poxvirus tienen genomas de ADN bicatenario grandes y entran en las células mediante un mecanismo independiente del pH a través de receptores que permanecen por definir. Los vectores de poxvirus se han usado extensamente para la expresión de genes recombinantes heterólogos y como vacunas (Moss, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11341-11348 (1996); y Paoletti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11349-11353 (1996)).

30 En otra realización, los nanotransportadores son retrovirus pseudotipados en los que la proteína env del retrovirus se reemplaza por la proteína de fibra corta adenoviral. Normalmente, se producen vectores retrovirales mediante "líneas celulares empaquetadas" que proporcionan las proteínas retrovirales necesarias para la infección (por ejemplo, env, gag y pol), pero que no pueden replicarse tras la infección. Véase, por ejemplo, Miller, AD, Current Topics 35



in Microbiology and Immunology, vol. 158, págs. 1-24 (1992). Los vectores retrovirales adecuados para su uso con la invención incluyen, sin limitación, vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MLV), e incluyen  
5 vectores derivados de retrovirus más complejos, por ejemplo, vectores derivados de lentivirus. Los vectores derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) pertenecen a esta categoría. Otros ejemplos incluyen vectores de lentivirus derivados de VIH-2, virus de la inmunodeficiencia felina  
10 (VIF), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) y virus maedi/visna.

En una realización más preferida, los nanotransportadores de la invención son adenovirus. En este caso, los adenovirus no son adenovirus del subgrupo F del  
15 mismo tipo que la proteína de fibra corta, es decir, si la proteína de fibra corta se deriva de un adenovirus Ad40, el nanotransportador puede ser otro adenovirus con la excepción de Ad40. A la inversa, si la proteína de fibra corta se deriva de un adenovirus Ad41, el nanotransportador puede ser  
20 cualquier adenovirus con la excepción de Ad41. Los adenovirus tienen un genoma de ADN bicatenario lineal. La infección por adenovirus de células diana se produce mediante tres interacciones ligando-receptor físicamente distintas. En primer lugar, el dominio knob de la proteína de fibra de la  
25 superficie viral se une específicamente a un receptor de la superficie celular. En el caso de células HeLa humanas, el receptor para los adenovirus 2 y 5 se designa como CAR, un miembro de la superfamilia de proteínas inmunoglobulinas, que también sirve como receptor celular para los virus de  
30 coxsackie B (Bergelson, 1996, Science, 275:1320-1323). En segundo lugar, la interacción tiene lugar entre la proteína de la base del pentón viral e integrinas alfaV. Un tercer sitio de unión al receptor está ubicado en la tercera repetición de espiral beta en el tallo de la fibra y media la unión a  
35 glucosaminoglucanos heparán sulfato (HSG). Otros polipéptidos

presentes en la superficie de partículas adenovirales incluyen las proteínas del capsómero que incluyen los hexones componentes principales así como cantidades minoritarias de pIIIa y pIX.

5           La alteración del direccionamiento adenoviral se ha llevado a cabo mediante la modificación de las proteínas del capsómero (Campos y Barry, 2006, *Virology*, 349:453-462) si bien es cierto que con eficacia inferior que mediante la modificación de la proteína de fibra. Por tanto, aunque la  
10 presente invención prevé la unión o fusión de la proteína de fibra corta con cualquier proteína de la superficie adenoviral, se prefiere que la unión o fusión se realice sobre al menos uno de los polipéptidos de superficie responsables de la unión a la célula diana. Por tanto, preferiblemente, el  
15 adenovirus puede modificarse o bien insertando o uniendo la proteína de fibra corta adenoviral del subgrupo F a la base del pentón o bien, más preferiblemente, a la propia proteína de fibra adenoviral.

20           Las fibras de adenovirus son proteínas triméricas que consisten en un dominio C-terminal globular (el dominio "knob"), un tallo fibroso central y una parte N-terminal (el dominio "tail") que se une a la cápsida viral. En presencia del dominio C-terminal globular, que es necesario para una correcta trimerización, el segmento de tallo adopta una  
25 conformación espiral beta triple. Las proteínas de fibra se incorporan como trímeros en la estructura de la cápsida. El experto apreciará que la incorporación de la proteína de fibra corta en la proteína adenoviral puede llevarse a cabo de diferentes maneras, dependiendo de si el tropismo nativo del  
30 adenovirus va a conservarse o suprimirse.

          En una realización preferida, es posible añadir las proteínas de fibra corta al extremo C-terminal de la fibra tal como se describió (Michael *et al.*, 1995, *Gene Therapy*, 2:660-668 y Wickham, T.J., *et al.*, 1997, *J. Virol.*, 71: 8221-8229).  
35 Alternativamente, es posible incorporar insertos en el bucle

HI de la fibra knob tal como se describió anteriormente (Nicklin *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72: 1844-1852 y Krasnykh, V., *et al.*, 1998, *J. Virol.*, 72: 1844-1852), un enfoque que se ha demostrado que tolera la introducción de ciertos péptidos mayores de 100 residuos sin afectar sustancialmente a la propagación e infectividad de los AdV resultantes. Además, es posible insertar la proteína de fibra corta dentro de una molécula espícula recombinante en la que el dominio de fibra knob solo o en combinación con (parte de) el dominio de tallo de la fibra se ha reemplazado por un dominio de trimerización exógeno tal como se describe por van Beusechem, V. W., *et al.*, (*Gene Ther.*, 2000, 7: 1940-1946 y Magnusson *et al.* (*J. Virol.*, 2001, 75: 7280-7289). Este enfoque tiene la ventaja de que permite ampliar la gama de posibles epítomos de direccionamiento así como elimina sitios de unión nativos que residen en la fibra knob. Las moléculas de espícula recombinante se denominan en el presente documento "fibras sin knob" o "proteínas de espícula de adenovirus quimérico". Una molécula de fibra sin knob o una proteína de espícula de adenovirus quimérico se define porque carece esencialmente de un dominio knob de fibra funcional, puede formar trímeros y puede unirse sobre una cápsida de adenovirus. Una "fibra sin knob" no significa por tanto que la molécula sea una proteína de fibra que carece del dominio knob. Aunque éste puede ser el caso, pueden faltar también otras regiones de la fibra, tales como el dominio de tallo o parte del mismo. Una proteína de espícula de adenovirus quimérico de la invención puede comprender además secuencias adicionales tales como secuencias de direccionamiento y/o secuencias espaciadoras/ligadoras. El dominio de "trimerización" de la proteína de fibra está ubicado, tal como se mencionó, en el dominio knob. Si el dominio knob se elimina de la fibra creando de ese modo una fibra no knob, se prefiere que la función de trimerización perdida la reemplacen otras secuencias que comprenden un denominado "dominio de trimerización". De lo contrario, no se

forman trimeros y no se incorporan fibras en la partícula de adenovirus. Se han producido en la técnica diferentes dominios de trimerización para reemplazar el dominio de trimerización de adenovirus. Pueden derivarse dominios de trimerización heterólogos de muchas clases diferentes de proteínas. Ejemplos no limitativos de proteínas de fibra sin knob de la invención se describen en el documento WO01/81607, en el documento WO01/02431 y en el documento WO 98/54346.

El dominio "tail" de la fibra proporciona la función de unión de la fibra a la cápsida del adenovirus. Esta función de unión se proporciona mediante una secuencia de localización nuclear, para transportar la fibra al núcleo en el que se ensamblan las partículas de adenovirus, y una secuencia de reconocimiento para unir la fibra a las proteínas de la base del pentón en la cápsida del adenovirus. Se prefiere que una fibra sin knob de la invención comprenda al menos una parte funcional de este dominio tail, en el que funcional significa proporcionar capacidad de unión a la cápsida del adenovirus cuando se expresa en una célula. Por tanto, una fibra sin knob de la presente invención comprende preferiblemente un dominio "tail" de la fibra de adenovirus y un dominio de trimerización heterólogo y/o que no es de adenovirus. Para los medios y el método para producir adenovirus que contienen fibras sin knob, se hace referencia al documento WO01/81607.

Se generan vectores adenovirales recombinantes mediante una variedad de técnicas que incluyen introducir un gen de interés deseado en un plásmido bacteriano en un sitio flanqueado por secuencias de adenovirus. Estas secuencias proporcionan elementos de control para la expresión génica y sirven como sitios para la recombinación con un genoma adenoviral compatible cuando se cotransfectan juntos en una línea celular de mamíferos apropiada (Horwitz, M. S., "Adenoviruses," en Fields Virology, tercera edición, editado por B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley et al., Lippincott-Raven Publishers: Filadelfia, Pa. (1996)).

Por tanto, la invención contempla el uso de cualquier serotipo adenoviral conocido conocido en la técnica e incluyendo, sin limitación, cualquiera de los serotipos definidos en la tabla 1.

5

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

Tabla 1: Algunos subgrupos y serotipos adenovirales a modo de ejemplo adecuados para su uso como nanotransportadores en la presente invención.

10

En una realización preferida, el adenovirus pertenece al serotipo 5 (Ad5) y se ha modificado incorporando la proteína de fibra corta del adenovirus 40 (denominado a continuación en el presente documento Ad5/40).

15

b. Nanotransportadores basados en VLP

20

En una realización, el nanotransportador usado en la presente invención es una VLP. La expresión "VLP o partícula de tipo viral", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura macromolecular autoensamblante formada por las nucleocápsidas virales que adquieren una estructura cuaternaria que se asemeja a la del virus del que se originan pero que carecen del material genético del virus.

25

Las VLP para su uso según la presente invención pueden formarse a partir de polipéptidos derivados de cualquier virus conocido en la técnica que tenga una estructura ordenada y repetitiva. Las VLP pueden producirse y purificarse a partir de cultivos celulares infectados con virus. El virus o

partícula similar a un virus resultante para el fin de vacuna necesita estar desprovisto de virulencia. Además de la ingeniería genética, pueden emplearse métodos físicos o químicos para inactivar la función del genoma viral, tales como irradiación UV, tratamiento con formaldehído. Alternativamente, la VLP es una VLP recombinante. El experto apreciará que casi todos los virus comúnmente conocidos de secuencia conocida pueden usarse para la generación de VLP siempre que el gen que codifica para la proteína o proteínas de la cubierta pueda identificarlo fácilmente un experto en la técnica. La preparación de VLP mediante la expresión recombinante de la proteína o proteínas de la cubierta en un huésped está dentro del conocimiento común de un experto en la técnica. Pueden obtenerse VLP adecuadas a partir de las proteínas de la nucleocápsida de un virus seleccionado del grupo que consiste en bacteriófagos de ARN, adenovirus, virus del mosaico de la papaya, virus de la gripe, norovirus, papilomavirus, hepadnavirus, virus respiratorio sincitial, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del sarampión; virus Sindbis; rotavirus, virus de la fiebre aftosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus Norwalk, alfavirus; SARS, paramixovirus, retrovirus del virus de la gastroenteritis transmisible, retrotransposón Ty, poliomavirus; virus del mosaico del tabaco; virus del escarabajo neozelandés (virus flock house), virus del moteado clorótico del caupí; virus del mosaico del caupí; y virus del mosaico de la alfalfa.

El ensamblaje apropiado del fragmento o mutante de la proteína recombinante o proteína de la cubierta en una VLP puede someterse a prueba, tal como apreciaría un experto en la técnica, expresando la proteína en *E. coli*, opcionalmente purificando las cápsidas mediante filtración en gel a partir de lisado celular, y analizando la formación de la cápsida en un ensayo de inmunodifusión (prueba de Ouchterlony) o mediante microscopía electrónica (ME) (Kozlovska, T. M.. et al, Gene

757:133-37 (1993)). Los ensayos de inmunodifusión y la ME pueden realizarse directamente en lisado celular.

c. Nanotransportadores basados en armazones proteicos

5 En otra realización, el nanotransportador usado en la presente invención es un armazón proteico. La expresión "armazón proteico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura macromolecular autoensamblante formada por una o más proteínas diferentes que pueden formar  
10 un entorno interno constreñido. Los armazones proteicos pueden tener diferentes tamaños de núcleo, que oscilan desde 1 hasta 30 nm (por ejemplo, el diámetro interno de las envueltas). Los armazones proteicos preferidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen armazones proteicos de ferritina,  
15 armazones de proteínas de choque térmico tal como se describen en el documento WO08124483 y similares.

d. Nanotransportadores basados en nanopartículas

20 En otra realización, los nanotransportadores son nanopartículas. Las nanopartículas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen nanopartículas lipídicas así como nanopartículas poliméricas.

25 Las nanopartículas poliméricas están formadas por una matriz polimérica que está unida al resto de direccionamiento de la fibra corta adenoviral. Los ejemplos no limitativos de polímeros biocompatibles que pueden ser útiles en las nanopartículas poliméricas según la presente invención incluyen polietilenos, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, polipropilfumaratos, policaprolactonas,  
30 poliamidas, poliacetales, poliéteres, poliésteres, poli(ortoésteres), policianoacrilatos, poli(alcoholes vinílicos), poliuretanos, polifosfacenos, poliacrilatos, polimetacrilatos, policianoacrilatos, poliureas, poliestirenos, o poliaminas, poliglutamato, dextrano,  
35 polianhídridos, poliuretanos, polimetacrilatos, poliacrilatos

o policianoacrilatos, polidioxanona (PDO), polihidroxicanoato, polihidroxitirato, poli(sebacato de glicerilo), poliglicolida, polilactida, PLGA, policaprolactona o combinaciones de los mismos.

5 Alternativamente, las nanopartículas de la invención pueden ser nanopartículas lipídicas tales como un liposoma o una micela. La formación de micelas y liposomas a partir de, por ejemplo, lípidos que forman vesículas, se conoce en la técnica. Lípidos que forman vesículas se refiere a lípidos que  
10 forman espontáneamente bicapas lipídicas por encima de su intervalo de temperatura de transición de fases cristalinas de gel a líquido. Tales lípidos tienen normalmente ciertas características que permiten la formación espontánea de bicapas, tales como zonas de sección transversal de cercana a  
15 idéntica de sus partes hidrófobas e hidrófilas que permiten su empaquetamiento en fases lamelares. Lípidos que pueden incorporarse de manera estable en bicapas lipídicas, tales como colesterol y sus diversos análogos, pueden incorporarse en la bicapa lipídica durante la formación de la bicapa. Los  
20 lípidos que forman vesículas son preferiblemente lípidos que tienen dos cadenas hidrocarbonadas, normalmente cadenas de acilo, y un grupo principal, o bien polar o bien no polar. Hay una variedad de lípidos sintéticos que forman vesículas y lípidos que forman vesículas que se producen de manera  
25 natural, incluyendo los fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilinositol y esfingomiélin, en los que las dos cadenas hidrocarbonadas tienen normalmente entre aproximadamente 14-22 átomos de carbono de longitud, y o bien  
30 están saturadas o bien tienen grados variables de insaturación. Los lípidos y fosfolípidos descritos anteriormente cuyas cadenas de acilo tienen grados variables de saturación pueden obtenerse comercialmente o prepararse según métodos publicados. Otros lípidos adecuados incluyen



fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos y esteroides, tales como colesterol.

5 Los nanotransportadores poliméricos y lipídicos pueden incluir adicionalmente un recubrimiento de un compuesto anfifílico que rodea el material polimérico formando una envuelta para la partícula o un material de ocultación que puede permitir que las partículas evadan su reconocimiento por componentes del sistema inmunitario y aumente la semivida de circulación de la partícula. El compuesto anfifílico puede ser, pero no se limita a, uno o una pluralidad de los 10 siguientes: lípidos derivados de manera natural, tensioactivos o compuestos sintetizados con ambos restos hidrófilo e hidrófobo. El disolvente miscible con agua puede ser, pero no se limita a: acetona, etanol, metanol y alcohol isopropílico. Por separado, se mezcla un material polimérico biodegradable 15 con el agente o agentes que van a encapsularse en un disolvente orgánico miscible con agua o parcialmente miscible con agua. En una realización preferida, el polímero biodegradable puede ser cualquiera de los polímeros biodegradables dados a conocer en el presente documento, por ejemplo, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido D,L-glicólico), 20 poli(épsilon-caprolactona), o sus copolímeros a diversas razones molares. Por ejemplo, los nanotransportadores pueden incluir un conjugado de polímero-poli(etilenglicol) o de lípido-poli(etilenglicol), para proporcionar un recubrimiento de la superficie externa de cadenas poliméricas. El polímero de poli(etilenglicol) es a modo de ejemplo, y son adecuados y se contemplan otros polímeros. La preparación de un lípido que forma vesículas derivado de un polímero hidrófilo para formar 25 un lipopolímero se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense número 5.013.556. Se apreciará también que el nanodispositivo polimérico o lipídico puede formarse a partir de múltiples capas del mismo material o uno diferente. 30

## B. LA PROTEÍNA DE FIBRA CORTA ADENOVIRAL DEL SUBGRUPO F

Los nanotransportadores de la invención contienen como resto de direccionamiento la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente  
5 equivalente del mismo.

La expresión "adenovirus del subgrupo F", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de virus también conocido como adenovirus entéricos caracterizados porque, en contraposición a otros adenovirus, no dependen de  
10 la interacción entre motivos RGD en la proteína de fibra y el receptor de integrina en la superficie de la célula diana para la entrada en la célula. En su lugar, los adenovirus del subgrupo F pueden usar un mecanismo alternativo para facilitar la endocitosis. En contraposición a todas las otras especies  
15 de adenovirus humano, los adenovirus entéricos se caracterizan también porque poseen dos proteínas de fibra diferentes, ambas de las cuales se encuentran en cada virión en números aproximadamente iguales. Hay una fibra larga, que se ha mostrado que se une al virus de coxsackie B virus y al  
20 receptor de adenovirus (CAR) y, adicionalmente, una fibra corta que no se une a CAR, y es de función desconocida. Es posible que estas dos propiedades únicas de adenovirus entéricos, concretamente la ausencia de un motivo RGD en la base del pentón y la presencia inusual de una segunda fibra estén relacionadas con la capacidad especial de estos virus  
25 para infectar células en el sistema gástrico humano. Características adicionales de los adenovirus entéricos son el punto isoeléctrico relativamente alto de sus proteínas estructurales, el aumento de viabilidad tras la exposición a un entorno ácido (tal como se encuentra en partes del tubo gástrico) y su capacidad para unirse a ciertos lípidos comúnmente encontrados en la mucosa gástrica, especialmente  
30 tras la exposición a un pH bajo. La invención puede llevarse a cabo usando cualquier adenovirus del subgrupo F conocido en la técnica tal como la proteína de fibra corta de los serotipos  
35

Ad40 (SEQ ID NO:1) o Ad41 (SEQ ID NO:2). En una realización preferida, la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F es la proteína de fibra corta de Ad40.

5 En la presente invención, el término "al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F" se refiere a cualquiera de los dominios de la proteína de la fibra corta de un adenovirus del subgrupo F que conserva la funcionalidad de direccionamiento de la proteína completa. Fragmentos de la proteína de fibra corta adecuados incluyen, 10 sin limitación, el dominio de cola, el dominio tallo o el dominio knob de una proteína de la fibra corta de un adenovirus del grupo F. El dominio de cola de Ad40 corresponde a los aminoácidos 1 a 42 de la secuencia SEQ ID NO:1, el dominio tallo de Ad40 corresponde a los aminoácidos 43 a 233 15 de la secuencia SEQ ID NO:1 y el dominio knob de Ad40 corresponde a los aminoácidos 234 a 387 de la secuencia SEQ ID NO:1. El dominio de cola de Ad41 corresponde a los aminoácidos 1 a 42 de la secuencia SEQ ID NO:2, el dominio tallo de Ad41 corresponde a los aminoácidos 43 a 233 de la secuencia SEQ ID 20 NO:2 y el dominio knob de Ad41 corresponde a los aminoácidos 234 a 387 de la secuencia SEQ ID NO:2.

La persona experta en la materia apreciará que el nanotransportador de la invención puede también contener como 25 restos de direccionamiento proteínas de fibra híbridas que comprenden la región de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F que es capaz de dirigir el nanotransportador a las células CD14+ y una región de una adenovirus de un subgrupo diferente. En una realización 30 preferida, dicho grupo de adenovirus diferente es un adenovirus del subgrupo C y, más preferentemente un adenovirus 1, 2, 5 o 6. Así, la proteína de fibra corta usada en los nanotransportadores de la invención puede estar formada por una proteína de fusión de un dominio knob de la fibra corta de 35 un adenovirus del subgrupo F (Ad40 o Ad41) y unas regiones de

tallo y cola de un adenovirus de un subgrupo diferente a F (por ejemplo Ad5). En otra realización, la proteína usada en los nanotransportadores de la invención puede estar formada por una proteína de fusión de los dominios knob y tallo de una fibra corta de un adenovirus del subgrupo F (Ad40 o Ad41) y la región cola de un adenovirus de un subgrupo diferente a F (por ejemplo Ad5). En una realización aún más preferida, la proteína de fibra corta contiene las regiones cola, tallo y knob de una proteína de un adenovirus del subgrupo F, preferentemente, de Ad40 o Ad41.

La invención se refiere además a variantes funcionalmente equivalentes de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F.

La expresión "variante funcionalmente equivalente" tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos que está alterada en uno o más aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia. La variante puede tener cambios "conservativos", en los que un aminoácido sustituido tiene propiedades químicas o estructurales similares, por ejemplo, el remplazamiento de leucina por isoleucina. Alternativamente, una variante puede tener cambios "no conservativos", por ejemplo, el remplazamiento de una glicina por un triptófano. Las variaciones minoritarias análogas pueden incluir también la delección o inserción de aminoácidos, o ambas.

Las variantes de la proteína de fibra del adenovirus del subgrupo F tienen preferiblemente una identidad de secuencia con la proteína de fibra de adenovirus de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. El grado de identidad entre las variantes y el ligando natural se determina usando métodos y algoritmos informáticos que conocen ampliamente los

5 expertos en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácido se determina usando el algoritmo BLASTP (BLASTManual, Altschul, S., et al, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 21 5: 403-410 (1990) aunque también pueden usarse otros algoritmos similares.

10 Ensayos adecuados para determinar si una determinada variante de una proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F es una variante funcionalmente equivalente de la misma es, por ejemplo, el método tal y como se describe en el ejemplo 4 de la presente invención basado de la habilidad de la proteína variante de fibra corta para dirigir un virus quimérico, cuya proteína es la variante de proteína de fibra  
15 corta, a células CD14+ (i.e. un monocito o un macrófago).

20 La proteína de fibra corta actúa como resto de direccionamiento para el nanotransportador y por tanto debe estar presente en la superficie exterior del nanotransportador. La proteína de fibra corta puede acoplarse al nanotransportador una vez que se ha formado o, alternativamente, puede incorporarse en la secuencia de las unidades de nanotransportador de modo que, tras el ensamblaje  
25 del nanotransportador, aparezca en la superficie exterior.

30 En el caso en el que la proteína de fibra corta se añada al nanotransportador preformado, esto puede realizarse añadiendo grupos funcionales al nanotransportador para su unión posterior a restos adicionales. Grupos funcionales preferidos para la unión son grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo y grupos tiol. Estos grupos funcionales pueden unirse entonces, o bien directa o bien indirectamente, a través del uso de un ligador. Los ligadores se conocen bien en la técnica; por ejemplo, se conocen bien ligadores homo o  
35 heterobifuncionales (véase el catálogo de 1994 de Pierce

Chemical Company, sección técnica sobre agentes reticulantes, páginas 155-200, así como el catálogo 2003, ambos de los cuales se incorporan al presente documento como referencia). Los ligadores preferidos incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo (incluyendo grupos alquilo sustituidos y grupos alquilo que contienen restos de heteroátomos), prefiriéndose grupos alquilo cortos, ésteres, grupos amida, amina, epoxi y etilenglicol y derivados, prefiriéndose especialmente propilo, acetileno y alqueno C2.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutamilo y asparaginilo para dar los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente de los nanotransportadores, si es apropiado, comprende alterar el patrón de glicosilación nativo de los polipéptidos que forman dicho nanotransportador. La expresión "alterar el patrón de glicosilación nativo" pretende significar para los fines del presente documento delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en la secuencia nativa del monómero del armazón, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa.

La adición de sitios de glicosilación a los polipéptidos del armazón puede conseguirse alterando la secuencia de aminoácidos de los mismos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en el polipéptido de secuencia nativa (para sitios de glicosilación O-unidos). La secuencia de aminoácidos puede alterarse opcionalmente a través de cambios al nivel del ADN, particularmente mutando el

ADN que codifica para el polipéptido en bases preseleccionadas de manera que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados. Otros medios de aumento del número de restos de hidratos de carbono en el polipéptido son mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

La eliminación de restos de hidratos de carbono presentes en el polipéptido puede conseguirse química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican para residuos de aminoácido que sirven como dianas para la glicosilación. Se conocen en la técnica técnicas de desglicosilación químicas y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y por Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en polipéptidos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas tal como se describe por Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de restos de nanotransportador comprende unir el polipéptido a uno de una variedad de polímeros nanoproteínáceos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes estadounidenses n.ºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. Esto encuentra un uso particular en el aumento de la semivida fisiológica de la composición.

En aquellas realizaciones en las que el nanotransportador es un nanotransportador lipídico, la unión de la proteína de fibra corta se lleva a cabo a través de medios químicos, tales como hacer reaccionar lípidos activados tales como PE-malimida para activar aminos libres de un anticuerpo con agentes tales como reactivo de Traut. Puede

incorporarse entonces la proteína de fibra corta conjugada a lípidos en la nanopartícula lipídica.

5 Los polipéptidos que forman los nanotransportadores de la presente invención también pueden modificarse de modo que se creen moléculas quiméricas que comprenden parte de toda la proteína nanotransportadora y la proteína de fibra corta o una variante de la misma. Esto se lleva a cabo habitualmente fusionando la proteína de fibra corta al extremo N o C-terminal del polipéptido que puede formar el nanotransportador. Alternativamente, la proteína de fibra corta puede colocarse dentro de un bucle interno del constituyente nanotransportado. Preferiblemente, el bucle interno se elige de modo que, tras el ensamblaje del nanotransportador, la proteína de fibra corta se expone en la superficie exterior del nanotransportador. En una realización, una molécula quimérica de este tipo comprende una fusión de un polipéptido nanotransportador (proteína de la cápsida viral, componente de VLP, componente de armazón proteico y similar) con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítipo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo de un polipéptido de armazón puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta de epítipo permite que el polipéptido de armazón se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una a la etiqueta de epítipo.

30 Se conocen bien en la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9,



3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 frente a la misma [Evan et al.,  
Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la  
etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y  
su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6):  
5 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el  
péptido Flag [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210  
(1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin et al., Science,  
255: 192-194 (1992)]; el péptido de epítipo de la tubulina  
[Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y  
10 la etiqueta de péptido de la proteína del gen 10 de T7 [Lutz-  
Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397  
(1990)].

El número de proteínas de fibra corta en cada  
nanotransportador no es limitativo en la presente invención  
15 siempre que se logre un direccionamiento eficaz de los  
nanotransportadores hacia las células CD14+ diana. Por  
consiguiente, el nanotransportador puede comprender desde tan  
sólo 1 proteína de fibra corta hasta tantas como varios miles.  
Se apreciará que, dependiendo del método usado para la  
20 preparación de los nanotransportadores, será posible ajustar  
el número de proteínas de fibra corta. Por tanto, si los  
nanotransportadores modificados con proteínas de fibra corta  
se obtienen mediante acoplamiento químico de la proteína de  
fibra corta a un nanotransportador activado, será posible  
25 obtener un número variable de proteínas de fibra corta en la  
superficie del nanotransportador dependiendo de la razón de  
proteína de fibra corta con respecto a nanotransportador usada  
durante la reacción de acoplamiento. Cuando la proteína de  
fibra corta se une al nanotransportador a través de  
30 interacciones específicas entre parejas de unión presentes en  
la proteína de fibra corta y el nanotransportador, será  
posible ajustar el número de proteínas de fibra corta en el  
nanotransportador añadiendo un número variable de parejas de  
unión en los monómeros que forman el nanotransportador.

C. USOS *IN VITRO* DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCION

Los nanotransportadores de la invención, en virtud de la presencia en su superficie de la proteína de fibra corta adenoviral, muestran una afinidad alta y selectiva hacia células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, hacia células mononucleares CD14<sup>+</sup>. Por tanto, los nanotransportadores son particularmente adecuados para suministrar el contenido de los nanotransportadores a células mononucleares del linaje de monocitos-macrófagos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para suministrar un compuesto de interés a una célula del linaje de monocitos-macrófagos que comprende poner en contacto dicha célula con un nanotransportador que porta dicho compuesto de interés y en el que el transportador contiene al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En una primera etapa, el método *in vitro* de la invención comprende poner en contacto el nanotransportador de la invención con una célula del linaje de monocitos-macrófagos. La expresión "una célula del linaje de monocitos-macrófagos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a células positivas CD14<sup>+</sup> derivadas de monoblastos.

La expresión "monoblasto" tal y como se usa en el presente documento se refiere a un tipo de células madre hematopoyéticas de alrededor de 12 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro que presenta una relación entre el citoplasma y el núcleo de cerca de 4:1 a 3:1, y, de manera similar a la mayoría de blastos mieloides, presenta un núcleo de redondo a ovalado con una estructura de cromatina fina. De uno a cuatro núcleos son visibles normalmente. El monoblasto es la primera etapa de la maduración monocito-macrófago. Las etapas de desarrollo de los monoblastos son: CFU-GM

(hemocitoblasto o célula madre hematopoyética pluripotencial), monoblasto, promonocito, monocito y macrófago. Células CD14+ derivadas de monoblastos incluye, sin limitación, monocitos, macrófagos y células dendríticas mieloides.

El término "monocito", tal y como se emplea aquí, se refiere a un tipo de glóbulos blancos que tienen dos funciones principales en el sistema inmune: (1) reponer los macrófagos residentes y las células dendríticas bajo estados normales y (2) en respuesta a señales inflamatorias, los monocitos se pueden mover rápidamente (aprox. 8-12 horas) a las zonas de infección en los tejidos y dividirse/diferenciarse en macrófagos y células dendríticas para obtener una respuesta inmune. La mitad de ellos son almacenados en el bazo. Los monocitos se identifican normalmente por sus grandes núcleos bilobulados en extensiones teñidas. Además de la expresión de CD14, los monocitos también muestran la expresión de uno o más de los siguientes marcadores de superficie 125I-WVH-1, 63D3, Adipofilina, CB12, CD11a, CD11b, CD15, CD54, Cd163, citidina deaminasa, Flt-1, y similares.

El término monocito incluye, sin limitación tanto el monocito clásico como el monocito pro-inflamatorio no clásico, ambos presentes en la sangre humana.

El término "el monocito clásico", tal como se emplea aquí, se refiere a un tipo de célula monocito caracterizada por el alto nivel de expresión del receptor de superficie celular CD14 (monocito CD14++) y el término "monocito pro-inflamatorio no clásico", tal y como se emplea aquí, se refiere a un célula con bajo nivel de expresión de CD14 y con la co-expresión adicional del receptor CD16 (monocito CD14+CD16+) los cuales se caracterizan por producir altas

cantidades de citoquinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral e interleuquina-12 en respuesta a la estimulación por productos microbianos. Estas células derivan de los monocitos CD14++.

5

El término "macrófago", como se emplea aquí, se refiere a células CD14+ positivas derivadas tras diferenciación de los monocitos y caracterizadas por ser fagocitos, actuando tanto en la defensa no específica (inmunidad innata) como en ayudar a iniciar los mecanismos de defensa específicos (inmunidad adaptativa) de los animales vertebrados. Su papel es fagocitar (engullir y luego digerir) los restos celulares y patógenos ya sea como células fijas o móviles y estimular a los linfocitos y otras células inmunes para responder ante el patógeno.

10

15

Además de la expresión de CD14, los macrófagos también muestran la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: CD11b, F4/80 (ratones)/EMR1 (humano), Lisozima M, MAC-1/MAC-3, 27E10, Carboxipeptidasa M, Catepsina K, CD163 y CD68. Estos marcadores pueden ser determinados por citometría de flujo o tinción inmunohistoquímica.

20

El término "célula dendrítica mielóide" tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una población de células dendríticas las cuales derivan de monocitos y las cuales incluyen, sin limitación, mDC-1 y mDC-2. Además de la expresión de CD14, las células dendríticas mieloides muestran además la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: ADAM19, BDCA-2, CDa, CD11c, CD21, CD86, CD208, Clusterina, Receptor de estrógenos alfa.

25

30

La etapa de puesta en contacto puede llevarse a cabo usando métodos convencionales conocidos en la técnica y dependerá del tipo de células que está seleccionándose. El método contempla el uso de cualquier nanotransportador adecuado tal como se definió en la sección anterior. Por

35

tanto, la célula del linaje de monocitos-macrófagos puede ponerse en contacto con un virus, una VLP, un armazón proteico o una nanopartícula siempre que el nanotransportador se modifique con la proteína de fibra corta adenoviral. En una  
5 realización preferida, el nanotransportador es un adenovirus y, más preferiblemente, un adenovirus de serotipo 5. Además, el nanotransportador puede contener cualquier proteína de fibra corta de adenovirus del subgrupo F tal como se definió anteriormente. En una realización preferida, la proteína de  
10 fibra corta es la proteína de fibra corta de Ad40.

Los nanotransportadores pueden usarse para suministrar un producto de interés a células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, a células mononucleares  
15 sanguíneas que expresan CD14+ tales como monocitos y macrófagos. El método *in vitro* según la invención es también adecuado para suministrar un compuesto de interés a líneas celulares establecidas monocíticas o similares a macrófagos tales como THP-1, U-937 y RAW 264.7. Además, el método *in vitro* de la invención también puede usarse para suministrar un  
20 compuesto de interés a células dendríticas derivadas de monocitos.

#### D. USOS DIAGNÓSTICOS DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCIÓN

Los nanotransportadores de la invención pueden usarse también para suministrar agentes de obtención de imágenes a  
25 células del linaje de monocitos-macrófagos, facilitando así su posterior identificación y cuantificación en muestras biológicas. En una realización preferida, los nanotransportadores de la invención se usan para la detección  
30 de células mononucleares CD14+ dado que los recuentos de monocitos alterados están asociados habitualmente con diferentes enfermedades tales como inflamación crónica, respuesta al estrés, hiperadrenocorticismos, enfermedad mediada por el sistema inmunitario, mononucleosis infecciosa,  
35

enfermedad piogranulomatosa, necrosis, regeneración de glóbulos rojos y fiebre viral. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de una enfermedad asociada con un recuento anómalo de células mononucleares sanguíneas CD14+ que comprende poner en contacto la célula mononuclear sanguínea CD14+ con un nanotransportador de la invención cargado previamente con un compuesto detectable y detectar las células mononucleares sanguíneas CD14+ siguiendo la pista del compuesto detectable.

Los métodos de diagnóstico según la invención usando los nanotransportadores de la invención implican habitualmente aislar células sanguíneas del paciente, poner en contacto las células con un nanotransportador cargado con agente para la obtención de imágenes según la invención y cuantificar el porcentaje de células sanguíneas en las que se detecta el agente para la obtención de imágenes. En otra realización, los conjugados de diagnóstico o de obtención de imágenes pueden administrarse al paciente como una composición de diagnóstico que comprende un conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable y después de eso pueden recogerse células sanguíneas del paciente para cuantificar el porcentaje de monocitos. En esta realización, la composición se formula normalmente para administración parenteral y se administra al paciente en una cantidad eficaz para permitir la obtención de imágenes de monocitos. Los agentes para la obtención de imágenes adecuados para su uso en los métodos de diagnóstico de la invención incluyen compuestos radiomarcados (por ejemplo, tecnecio, galio, indio y radionúclidos que emiten positrones o agente de obtención de imágenes por PET) y cromóforos tales como, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, ficoeritrina, verde Oregón, AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene, Oreg.), Cy3, Cy5, Cy7 y similares.

El diagnóstico se produce normalmente antes del tratamiento. Sin embargo, en los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento, el término "diagnóstico"

también puede significar la monitorización del estado patológico antes, durante o tras el tratamiento para determinar la evolución del estado patológico. La monitorización puede producirse antes, durante o tras el tratamiento, o combinaciones de los mismos, para determinar la eficacia de la terapia, o para predecir futuros episodios de la enfermedad. La obtención de imágenes puede llevarse a cabo mediante cualquier método de obtención de imágenes adecuado conocido en la técnica, tal como obtención de imágenes intravitales.

El método de diagnóstico contempla el uso de cualquier nanotransportador adecuado tal como se definió en la sección anterior. Por tanto, la célula del linaje de monocitos-macrófagos puede ponerse en contacto con un virus, una VLP, un armazón proteico o una nanopartícula siempre que el nanotransportador se modifique con la proteína de fibra corta adenoviral. En una realización preferida, el nanotransportador es un adenovirus y, más preferiblemente, un adenovirus de serotipo 5. Además, el nanotransportador puede contener cualquier proteína de fibra corta de adenovirus del subgrupo F tal como se definió anteriormente. En una realización preferida, la proteína de fibra corta es la proteína de fibra corta de Ad40.

#### E. USOS MÉDICOS DE LOS NANOTRANSPORTADORES DE LA INVENCIÓN

La interacción eficaz y específica de los nanotransportadores de la invención con células del linaje de monocitos-macrófagos permite el uso de dichos nanotransportadores para el tratamiento de cualquier enfermedad en la que es deseable suministrar un compuesto de interés a células del linaje de monocitos-macrófagos. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus

del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en medicina.

Según la presente invención, un "producto de interés" tal y como se define en el presente documento, se refiere a cualquier agente ("carga útil"), incluyendo, por ejemplo, agentes terapéuticos (por ejemplo agentes quimioterápicos anti-cáncer), agentes de diagnóstico (por ejemplo agentes de contraste; radionúclidos; y restos fluorescentes, luminiscentes y magnéticos), agentes profilácticos (por ejemplo vacunas) y/o agentes nutracéuticos (por ejemplo vitaminas, minerales, etc.) mediante los nanotransportadores de la invención. Agentes a modo de ejemplo que van suministrarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas (por ejemplo agentes citotóxicos), ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes de ADNc, ARNip, ARNi y microARN), proteínas (por ejemplo anticuerpos), péptidos, lípidos, hidratos de carbono, hormonas, metales, compuestos y elementos radiactivos, fármacos, vacunas, agentes inmunológicos, etc., y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente que va a suministrarse es un agente útil en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata). En una realización particular, el fármaco u otra carga útil se libera de una manera de liberación controlada a partir de la partícula y se deja interaccionar localmente con el sitio de selección como diana particular (por ejemplo, un tumor). La expresión "liberación controlada" (y variantes de esa expresión) tal como se usa en el presente documento (por ejemplo en el contexto de "sistema de liberación controlada" pretende abarcar generalmente la liberación de una sustancia (por ejemplo, un fármaco o una proteína) en un sitio seleccionado o de otra forma en una cantidad, un intervalo y/o una tasa controlables. La liberación controlada abarca, pero no se limita necesariamente a, un suministro sustancialmente continuo, un suministro en patrón (por ejemplo, suministro intermitente a lo largo de un periodo de tiempo que está



interrumpido por intervalos de tiempo regulares o irregulares) y el suministro de un bolo de una sustancia seleccionada (por ejemplo, como una cantidad predeterminada, diferenciada si se suministra una sustancia a lo largo de un periodo de tiempo relativamente corto (por ejemplo, unos cuantos segundos o minutos). Por ejemplo, una parte de direccionamiento puede provocar que las partículas se localicen en un tumor, un sitio de enfermedad, un tejido, un órgano, un tipo de célula, etc. dentro del cuerpo de un sujeto, dependiendo del resto de direccionamiento usado. Por ejemplo, un resto de direccionamiento, por ejemplo un aptámero, puede localizarse en células de cáncer de próstata.

En realizaciones particulares, el agente que va a suministrarse es un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en ARNip, ARNhc, microARN, ribozimas, plásmidos de ADN, aptámeros, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos aleatorizados o ribozimas naturales o no naturales.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un agente auxiliar de formulación, material de encapsulación, diluyente o carga líquido, semisólido o sólido, inerte, no tóxico de cualquier tipo. Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. por Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 da a conocer diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de

soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; detergentes tales como TWEEN™ 80; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y también pueden estar presentes en la composición disoluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y de perfume, conservantes y antioxidantes, según el juicio del formulador. Si no son viables la filtración u otros métodos de esterilización terminal, las formulaciones pueden fabricarse en condiciones asépticas.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un paciente mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo las vías oral y parenteral. Según tales realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, intraperitoneal), por vía rectal, por vía vaginal, por vía tópica (tal como mediante polvos, cremas, pomadas o gotas) o mediante inhalación (tal como mediante pulverizadores).

En una realización particular, los nanotransportadores de la presente invención se administran a un sujeto que los necesita de manera sistémica, por ejemplo mediante inyección o infusión i.v. Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones oleaginosas o acuosas inyectables estériles según la técnica conocida usando agentes de suspensión y agentes humectantes o de dispersión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una emulsión, suspensión o disolución inyectable estéril en un disolvente o diluyente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y

disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, solución de Ringer, U.S.P. y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijados, estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijado insípido que incluya mono o diglicéridos sintéticos. Además, se usan ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de inyectables. En una realización, el conjugado de la invención se suspende en un fluido vehículo que comprende carboximetilcelulosa de sodio al 1% (p/v) y TWEEN™ 80 al 0,1% (v/v). Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o mediante la incorporación de agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Las composiciones para administración rectal o vaginal pueden ser supositorios que pueden prepararse mezclando el conjugado de la invención con vehículos o excipientes no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por tanto se funden en la cavidad de la vagina o el recto y liberan el conjugado de la invención.

Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de una composición farmacéutica de la invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, pulverizadores, inhalantes o parches. El conjugado de la invención se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario que pueda requerirse. Se contempla también que formulaciones oftálmicas, gotas de los oídos y gotas oculares estén dentro del alcance de esta invención. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de los conjugados de esta invención,

excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los parches transdérmicos tienen la ventaja de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al organismo. Tales formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispensando los conjugados de la invención en un medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa puede controlarse o bien proporcionando una membrana de control de la tasa o dispersando los conjugados de la invención en un gel o una matriz de polímero. Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de los conjugados inventivos de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de los mismos. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente propelentes habituales tales como clorofluorohidrocarburos. Cuando se administra por vía oral, el nanotransportador de la invención puede encapsularse, aunque no necesariamente. Se conoce en la técnica una variedad de sistemas de encapsulación adecuados ("Microcapsules and nanoparticles in Medicine and Pharmacy", editado por Doubrow, M., CRC Press, Boca Raton, 1992; Mathiowitz y Langer J. Control. Release 5:13, 1987; Mathiowitz et al. Reactive Polimers 6:275, 1987; Mathiowitz et al. J. Appl. Polimer Sci. 35:755, 1988; Langer Ace. Chem. Res. 33:94,2000; Langer J. Control. Release 62:7,1999; Uhrich et al. Chem. Rev. 99:3181,1999; Zhou et al. J. Control. Release 75:27, 2001; y Hanes et al. Pharm. Biotechnol. 6:389,1995). Los conjugados de la invención pueden encapsularse dentro de liposomas o microesferas poliméricos biodegradables. Los ejemplos de polímeros naturales y sintéticos útiles en la preparación de microesferas biodegradables incluyen hidratos de carbono tales como alginato, celulosa, polihidroxialcanoatos, poliamidas,

polifosfacenos, polipropilfumaratos, poliéteres, poliacetales, policianoacrilatos, poliuretanos biodegradables, policarbonatos, polianhídridos, polihidroxiácidos, poli(ortoésteres) y otros poliésteres biodegradables. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos y gangliósidos.

10 Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las formas farmacéuticas líquidas adecuadas para administración oral de composiciones de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de un conjugado encapsulado o no encapsulado, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes de solubilización y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

25 Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden incluir también adyuvantes, agentes humectantes, 30 agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes y de perfume. Tal como se usa en el presente documento, el término "adyuvante" se refiere a cualquier compuesto que sea un modulador no específico de la respuesta inmunitaria. En ciertas realizaciones, el adyuvante estimula la respuesta inmunitaria. Puede usarse cualquier adyuvante 35

según la presente invención. Se conoce en la técnica un gran número de compuestos adyuvantes (Allison Dev. Biol. Stand. 92:3-11, 1998; Unkeless *et al.* Annu. Rev. Immunol. 6:251-281,1998; y Phillips *et al.* Vaccine 10:151-158,1992).

5 Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el conjugado encapsulado o no encapsulado se mezcla con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, inerte tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o (a) cargas o extendedores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, (c) humectantes tales como glicerol, (d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, (e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, (f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) absorbentes tales como arcilla de bentonita y caolín, e (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede comprender también agentes de tamponamiento. Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en capsulas de gelatina llenas duras y blandas usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envueltas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Se

10

15

20

25

30

35

apreciará que la dosificación exacta de la partícula de micela inversa dirigida la elige el médico individual en vista del paciente que va a tratarse, en general, la dosificación y administración se ajustan para proporcionar una cantidad eficaz de la partícula dirigida al paciente que está tratándose. Tal como se usa en el presente documento, la "cantidad eficaz" de una partícula dirigida se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada. Tal como apreciarán los expertos habituales en esta técnica, la cantidad eficaz de la partícula dirigida puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, el fármaco que va a suministrarse, el tejido diana, la vía de administración, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de partícula dirigida que contiene un fármaco anticancerígeno podría ser la cantidad que da como resultado una reducción del tamaño del tumor en una cantidad deseada a lo largo de un periodo de tiempo deseado. Los factores adicionales que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado patológico; la edad, el peso y el sexo del paciente que está tratándose; la dieta, el tiempo y la frecuencia de administración; las combinaciones de fármacos; las sensibilidades a la reacción; y la tolerancia/respuesta a la terapia.

Los nanotransportadores de la invención pueden formularse en forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria" tal como se usa en el presente documento se refiere a una unidad físicamente diferenciada de nanotransportador apropiada para el paciente que va a tratarse. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico encargado dentro del alcance del juicio médico seguro. Para cualquier nanotransportador, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente o bien en ensayos de cultivo celular o bien en modelos animales,

habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal se usa también para lograr un intervalo de concentración y una vía de administración deseables. Tal información puede usarse entonces para determinar dosis y vías útiles para la administración en seres humanos. La toxicidad y eficacia terapéutica de los nanotransportadores puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE50 (la dosis es terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y DL50 (la dosis es letal para el 50% de la población). La razón de dosis de efectos tóxicos con respecto a terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la razón DL50/DE50. Composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes pueden ser útiles en algunas realizaciones. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos.

El nanotransportador de la invención puede usarse para suministrar un compuesto de interés a monocitos no diferenciados y no estimulados, células del linaje de monocitos-macrófagos, que incluye células mononucleares sanguíneas CD14+ así como otros tipos de células derivadas de células sanguíneas CD14+ como resultado de procesos de diferenciación o maduración espontánea o inducida y, por tanto, es adecuado para el tratamiento de enfermedades en las que están implicadas tales células. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de



monocitos-macrófagos que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de un nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de un nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.

La expresión "enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos" se refiere a cualquier enfermedad provocada o aumentada por células del linaje de monocitos-macrófagos así como a cualquier enfermedad provocada por una actividad deficiente o un número de células reducido del linaje de monocitos-macrófagos. En una realización preferida, la célula del linaje de monocitos-macrófagos es un monocito o una célula sanguínea mononuclear primaria, en cuyo caso la enfermedad se selecciona del grupo de:

- (i) una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada
- (ii) una enfermedad inflamatoria y
- (iii) una enfermedad caracterizada por una proliferación no deseada de células del linaje de monocitos-macrófagos.

Enfermedades caracterizadas por una respuesta inmunitaria alterada

La expresión "una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada" se refiere a enfermedades en las que el organismo reacciona de manera anómala frente a agentes infecciosos exógenos sin desencadenar una respuesta inmunitaria completa. La expresión "una enfermedad

caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada" también incluye enfermedades en donde el organismo reacciona anormalmente contra componentes endógenos desencadenándose una respuesta inmunitaria que conduce a una enfermedad autoinmunitaria. Preferentemente, la enfermedad es una enfermedad infecciosa o una enfermedad alérgica.

En el caso en el que la respuesta inmunitaria desencadenada por el organismo frente a un agente infeccioso no sea suficiente, pueden usarse los nanotransportadores de la invención para suministrar péptidos antigénicos del agente infeccioso a células sanguíneas CD14+. Las células CD14+ se diferenciarán en células dendríticas, actuando así como células presentadoras de antígenos y presentando el péptido antigénico a los mediadores de la respuesta inmunitaria humoral y celular. En una realización alternativa, los nanotransportadores de la invención pueden usarse para suministrar péptidos antigénicos a células dendríticas derivadas de monocitos que actuarán entonces como células presentadoras de antígenos a mediadores de la respuesta inmunitaria humoral y celular. Por tanto, en una realización, los nanotransportadores de la invención comprenden péptidos antigénicos o ácidos nucleicos que codifican para dichos péptidos antigénicos. Los péptidos antigénicos adecuados que pueden usarse en los nanotransportadores de la invención incluyen pero no se limitan a, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno fúngico, un antígeno de diferenciación, un antígeno tumoral, un antígeno embrionario, un antígeno de oncogenes y genes supresores de tumores mutados, un antígeno tumoral único que resulta de translocaciones cromosómicas y/o derivados de los mismos.

Los antígenos virales que pueden provocar una respuesta inmunitaria contra el virus incluyen antígenos de VIH-1, (tales como tat, nef, gp120 o gp160, gp40, p24, gag, env, vif, vpr, vpu, rev), virus del herpes humano, (tales como gH, gL gM gB gC gK gE o gD o derivados de los mismos o proteína temprana

inmediata tal como ICP27, ICP47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2, citomegalovirus, especialmente humano, (tal como gB o derivados del mismo), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus varicela zoster (tal como gpl, II, Ill e IE63), o de un virus de hepatitis tal como virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de la hepatitis B o antígeno del núcleo de la hepatitis), virus de la hepatitis C (por ejemplo antígenos del núcleo E1, NS3 o NS5), de paramixovirus tales como virus respiratorio sincitial (tal como proteínas F y G o derivados de las mismas), de virus parainfluenza, del virus de la rubéola (tal como proteínas E1 y E2), virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo VPH6, 11, 16, 18, eg LI, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del Dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o células con virus de la gripe, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), antígenos de rotavirus (tales como VP7sc y otros componentes rotavirales), y similares (véase Fundamental Virology, segunda edición, eds. Fields, B. N. y Knipe, D. M. (Raven Press, Nueva York, 1991) para ejemplos adicionales de antígenos virales).

Los antígenos bacterianos incluyen antígenos tales como de *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PiIC y adhesinas); antígenos de *S. pyogenes* (tales como proteínas M o fragmentos de las mismas y proteasa C5A); antígenos de *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (tal como invasinas y adhesinas de alto y bajo peso molecular); antígenos de *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo *parapertussis* y *B. bronchiseptica* (tal como pertactina, toxina pertúsica o derivados de las mismas, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbrias); antígenos de *Mycobacterium spp.*,

incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; (por ejemplo ESAT6, antígeno 85A, -B o -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSPIO, HSP65, HSP70, HSP 75, HSP90, PPD 19 kDa [Rv3763], PPD 38 kDa [Rv0934]); antígenos de *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), antígenos de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina del tipo toxina Shiga o derivados de la misma); antígenos de *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); antígenos de *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop); antígenos de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas); antígenos de *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); antígenos de *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivados de la misma); antígenos de *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma), antígenos de *C. difficile* (por ejemplo toxinas clostridiales A o B y derivados de las mismas); antígenos de *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina del ántrax y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); antígenos de *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB); antígenos de *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA,

DbpB), antígenos de *B. andersonfi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), antígenos de *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la erliquiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina); antígenos de *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), antígenos de *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana externa raras), antígenos de *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; antígenos de *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.* y *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAGS, Tg34); antígenos de *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levadura tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*; antígenos de *M. tuberculosis* (tales como Rv2557, Rv2558, RPF: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c de 16 kDal, Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1); antígenos de *Chlamydia* (tales como la proteína de alto peso molecular (HWMP), ORF3 (documento EP 366 412), y proteínas putativas de membrana (Pmp); antígenos de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina, el antígeno proteico pneumolisina, y derivados detoxificados mutantes de las mismas); antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo); antígenos de *H. influenzae* no tipificable (tal como OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de

fimbrina, o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de las mismas); antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* (tales como RTS.S, TRAP, MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*)

Antígenos fúngicos para su uso en los nanotransportadores de la invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, componentes de antígenos fúngicos de *Candida*; antígenos fúngicos de *Histoplasma* tales como proteína de choque térmico 60 (HSP60) y otros componentes de antígenos fúngicos de *Histoplasma*; antígenos fúngicos criptocócicos tales como polisacáridos capsulares y otros componentes de antígenos fúngicos criptocócicos; antígenos fúngicos de *Coccidioides* tales como antígenos de esférulas y otros componentes de antígenos fúngicos de *Coccidioides*; y antígenos fúngicos de *Tinea* tales como tricofitina y otros componentes de antígenos fúngicos de *Coccidioides*.

Los antígenos de protozoos incluyen, pero no se limitan a, antígenos de *Plasmodium falciparum* tales como antígenos de superficie del merozoíto, antígenos de superficie del esporozoíto, antígenos de circumsporozoíto, antígenos de superficie de gametocito/gameto, antígeno pf de fase sanguínea, 55/RESA y otros componentes de antígenos de *Plasmodium*; antígenos de *Toxoplasma* tales como SAG-I, p30 y otros componentes de antígenos de *Toxoplasma*; antígenos de *Schistosoma* tales como glutatión-S-transferasa, paramiosina y otros componentes de antígeno de *Schistosoma*; antígenos de *Leishmania major* y otros antígenos de *Leishmania* tales como gp63, lipofosfoglicano y su proteína asociada y otros componentes de antígenos de *Leishmania*; y antígenos de *Trypanosoma cruzi* tales como el antígeno de 75-77 kDa, el antígeno de 56 kDa y otros componentes de antígenos de *Trypanosoma*.

El antígeno puede ser un alérgeno o un antígeno ambiental, tal como, pero sin limitarse a, un antígeno derivado de alérgenos que se producen de manera natural tales como alérgenos del polen (alérgenos del polen de árboles, hierbas, plantas adventicias y césped), alérgenos de insectos (alérgenos respirables, de la saliva y del veneno), alérgenos de la caspa y del pelo de los animales, y alérgenos alimentarios. Importantes alérgenos del polen de árboles, céspedes y hierbas se originan a partir de los órdenes taxonómicos de Fagales, Oleales, Pinóles y Platanáceas incluyendo La. abedul (*Betula*), aliso (*Alnus*), avellano (*Corylus*), carpe (*Carpinus*) y olivo (*Olea*), cedro (*Cryptomeria* y *Juniperus*), plátano (*Platanus*), incluyendo el orden de Poales entre otros céspedes de los géneros *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis*, *Holcus*, *Phalaris*, *Secale* y *Sorghum*, incluyendo los órdenes de Asterales y Urticales entre otros hierbas de los géneros *Ambrosia*, *Artemisia* y *Parietaria*. Otros antígenos alérgenos que pueden usarse incluyen alérgenos de ácaros del polvo doméstico del género *Dermatophagoides* y *Euroglyphus*, ácaros de almacén por ejemplo *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* y *Tyrophagus*, aquéllos de cucarachas, mosquillas y pulgas por ejemplo *Blatella*, *Periplaneta*, *Chironomus* y *Ctenocephalides*, aquéllos de mamíferos tales como gato, perro y caballo, aves, alérgenos del veneno incluyendo los que se originan de insectos que pican o muerden tales como aquéllos del orden taxonómico de Hymenoptera incluyendo las abejas (superfamilia Apidae), avispas y hormigas (superfamilia Formicoidae). Todavía otros antígenos alérgenos que pueden usarse incluyen alérgenos de inhalación de hongos tales como de los géneros *Alternaria* y *Cladosporium*.

El antígeno puede ser también un antígeno tumoral tal como MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAbp), ciclofilina b, antígeno asociado al cáncer colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, antígeno carcinoembrionario (CEA) y sus

epítomos antigénicos CAP-1 y CAP-2, etv6, aml1, antígeno específico de próstata (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2 y PSA-3, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), receptor de células T/cadena CD3- $\zeta$ , familia MAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), familia GAGE de antígenos tumorales (por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, tirosinasa, p53, familia MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1,  $\alpha$ -fetoprotein, E-cadherina,  $\alpha$ -catenina, 13-catenina,  $\gamma$ -catenina, p120ctn, gp100<sup>Pme1117</sup>, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), fodrina, conexina 37, idiotipo de Ig, p15, gp75, gangliósidos GM2 y GD2, productos virales tales como proteínas del virus de papiloma humano, familia Smad de antígenos tumorales, lmp-1, P1A, antígeno nuclear codificado por VEB (EBNA)-1, glicógeno fosforilasa cerebral, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y CT-7, y c-erbB-2, leucemia linfoblástica aguda (etv6, aml1, ciclofilina b), linfoma de células B (idiotipo de Ig), glioma (E-cadherina,  $\alpha$ -catenina, 13-catenina, 7-catenina, p120ctn), cáncer de vejiga (p21ras), cáncer biliar (p21ras), cáncer de mama (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2), carcinoma cervicouterino (p53, p21ras), carcinoma de colon (p21ras, HER2/neu, c-erbB-2, familia MUC), cáncer colorrectal (antígeno asociado al cáncer colorrectal (CRC)-0017-1A/GA733, APC), coriocarcinoma (CEA), cáncer de células epiteliales (ciclofilina b), cáncer gástrico (HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin (lmp-1, EBNA-1), cáncer de pulmón (CEA, MAGE-3, NY-ESO-1), leucemia derivada de células linfoides (ciclofilina b), melanoma (proteína p15, gp75, antígeno oncofetal, gangliósidos GM2 y GD2, MelanA/MART-1, cdc27, MAGE-3, p21ras, gp100<sup>Pme1117</sup>),



mieloma (familia MUC, p21ras), carcinoma de pulmón de células no pequeñas (HER2/neu, c-erbB-2), cáncer nasofaríngeo (lmp-1, EBNA-1), cáncer de ovarios (familia MUC, HER2/neu, c-erbB-2),  
5 cáncer de próstata (antígeno prostático específico (PSA) y sus epítomos antigénicos PSA-1, PSA-2, y PSA-3, PSMA, HER2/neu, c-erbB-2, glicoproteína ga733), cáncer renal (HER2/neu, c-erbB-2), cánceres de células escamosas del cuello uterino y del esófago (productos virales tales como proteínas del virus de papiloma humano), cáncer testicular (NY-ES0-1) y leucemias de  
10 células T (epítomos de VLTH-1).

El experto apreciará que los nanotransportadores cargados con antígeno de la invención pueden usarse mediante administración directa a un paciente que lo necesita o, alternativamente, pueden usarse también para tratamiento ex vivo. Para este fin, pueden aislarse monocitos del paciente,  
15 ponerse en contacto con los nanotransportadores de la invención y, o bien administrarse directamente de nuevo al paciente, o bien, alternativamente, dejar que se diferencien en células dendríticas que se suministrarán entonces al paciente. En la técnica se conocen métodos para promover la diferenciación *in vitro* de monocitos en células dendríticas (por ejemplo usando una combinación de GM-CSF e IL-4 o usando métodos tales como los descritos en el documento WO06012359).

En otro aspecto, los nanotransportadores de la invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades  
25 caracterizadas por un aumento de la respuesta inmunitaria hacia componentes celulares endógenos (es decir, enfermedades autoinmunitarias). Los estados patológicos a modo de ejemplo incluyen fibromialgia, artritis reumatoide, artrosis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, psoriasis, osteomielitis,  
30 esclerosis múltiple, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, esclerosis sistémica, rechazo de trasplante de órganos (GVHD), lupus eritematoso, síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, inflamaciones de la piel (por ejemplo, psoriasis) e inflamaciones crónicas. Para este fin, los  
35

nanotransportadores se cargan con componentes citotóxicos que conducirán a una reducción en el número de monocitos y, por tanto, a una disminución en el número de células dendríticas. Los compuestos citotóxicos a modo de ejemplo que pueden usarse en los nanotransportadores de la invención incluyen clodronato, toxina del ántrax, exotoxina de *Pseudomonas*, normalmente modificados de modo que estos restos citotóxicos no se unen a células normales, y otras toxinas o agentes citotóxicos incluyendo agentes quimioterápicos tales como adrenocorticoides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, estrógenos, antimetabolitos tales como arabinósido de citosina, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, ciclofosfamida, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxiaurea, tenipósido, y bleomicina, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, inhibidores de MEK cinasa, inhibidores de la ruta de MAP cinasa, inhibidores de PI-3-cinasa, perturbadores mitocondriales, inhibidores de la ruta de NFκB, inhibidores de proteosomas, agentes proapoptóticos, glucocorticoides, tales como prednisolona, flumetasona, dexametasona y betametasona, indometacina, diclofenaco, proteínas tales como de fitolaca, saporina, momordina y gelonina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la síntesis de proteínas, didemmina B, verrucarina A, geldanamicina y similares.

#### Enfermedades inflamatorias

Se sabe que los monocitos migran a los sitios de inflamación en respuesta a CCL2. Por tanto, la presente invención contempla el uso de los nanotransportadores de la invención para suministrar agentes antiinflamatorios a monocitos que se suministrarán entonces a los sitios de inflamación. Por tanto, los nanotransportadores de la invención pueden cargarse con un agente antiinflamatorio y

usarse para suministrar dicho agente a un sitio de inflamación. Los agentes antiinflamatorios que pueden incorporarse en los nanotransportadores de la invención incluyen, sin limitación, agentes antiinflamatorios esteroideos, tales como hidrocortisona, hidroxiltriamcinolona, alfa-metil dexametasona, fosfato de dexametasona, dipropionato de beclometasona, valerato de clobetasol, desonida, desoximetasona, acetato de desoxicorticosterona, dexametasona, diclorisona, diacetato de diflorasona, valerato de diflucortolona, fluadrenolona, acetónido de fluclorolona, fludrocortisona, pivalato de flumetasona, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, éster butílico de flucortina, fluocortolona, acetato de fluprednidenol (fluprednilideno), flurandrenolona, halcinonida, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, metilprednisolona, acetónido de triamcinolona, cortisona, cortodoxona, flucetonida, fludrocortisona, diacetato de difluorasona, acetónido de fluradrenolona, medrisona, amcinafel, amcinafida, betametasona y el equilibrio de sus ésteres, cloroprednisona, acetato de cloroprednisona, clocortelona, clescincinolona, diclorisona, difluprednato, flucloronida, flunisolido, fluorometalona, fluperolona, fluprednisolona, valerato de hidrocortisona, ciclopentilpropionato de hidrocortisona, hidrocortamato, meprednisona, parametasona, prednisolona, prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona y mezclas de los mismos. Los nanotransportadores pueden contener también agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como oxicams (piroxicam, isoxicam, tenoxicam, sudoxicam y CP-14.304), salicilatos (aspirina, disalcid, benorilato, trilisato, safaprina, solprina, diflunisal y fendosal), derivados de ácido acético (diclofenaco, fenclofenaco, indometacina, sulindaco, tolmetina, isoxepaco, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acetaminofeno, fentiazaco, zomepiraco, clidanaco, oxepinaco y felbinaco), fenamatos (ácidos mefenámico, meclofenámico, flufenámico, niflúmico y

tolfenámico), derivados de ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, fenbufeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno, miroprofeno, tioxaprofeno, 5 suprofeno, alminoprofeno y ácido tiaprofénico), pirazoles (fenibutazona, oxifenbutazona, feprazona, azapropazona y trimetazona), derivados de ácido acrilacético, derivados de ácido arilbutírico, ácidos arilcarboxílicos, derivados de ácido arilpropiónico, pirazoles, pirazolonas, 10 tiazincarboxamidas, ácido e-acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, bendazaco, bencidamina, bucolomo, difenpiramida, ditazol, emorfazona, guaiazuleno, nabumetona, nimesulida, orgoteina, oxaceprol, paranilina, perisoxal, pifoxima, 15 procuazona, proxazol y tenidap.

Las enfermedades inflamatorias que pueden tratarse con los nanotransportadores según la invención incluyen, sin limitación, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artrosis, artritis psoriásica, artritis asociada a lupus o espondiloartritis anquilosante), 20 esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, esclerosis múltiple, tiroiditis autoinmunitaria, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), enfermedades cutáneas autoinmunitarias, miastenia grave, 25 enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), enfermedad de Crohn, colitis, colitis ulcerosa, diabetes mellitus (tipo I) y similares.

Enfermedades asociadas con un aumento de proliferación/actividad de células del linaje de monocitos-macrófagos

En otra realización, los nanotransportadores de la invención son adecuados para el tratamiento asociado con un aumento de proliferación o actividad de una célula del linaje de monocitos-macrófagos. Estas enfermedades incluyen:

- enfermedades hiperproliferativas del linaje de monocitos/macrófagos
- enfermedades que resultan de un aumento de la producción de interleucina-1 (IL-1) por monocitos y
- 5 - enfermedades que resultan de un aumento de la producción de TNF- $\alpha$  por monocitos.

Estas enfermedades pueden tratarse reduciendo el número de monocitos usando los nanotransportadores de la invención para el suministro de compuestos citotóxicos tal como se definió anteriormente.

10 En una realización, los nanotransportadores de la invención pueden usarse para el tratamiento de una enfermedad asociada con una proliferación no deseada de células del linaje de monocitos-macrófagos como leucemia monocítica crónica o aguda, leucemia mielomonocítica crónica o aguda y

15 leucemia mielomonocítica juvenil. Las enfermedades hiperproliferativas del linaje de monocitos/macrófagos que pueden tratarse con compuestos citotóxicos suministrados usando los nanotransportadores de la invención incluyen, entre otras, la mononucleosis.

20 En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya está afectado por la enfermedad particular, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente el estado y sus complicaciones.

25 Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz" o "dosis eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del estado, el estado general del paciente y la vía de administración. Pueden suministrarse suspensiones de

30 partículas infecciosas de adenovirus mediante diversas vías, incluyendo intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica y tópica. Puede administrarse una suspensión de adenovirus que contiene de aproximadamente  $10^3$  a  $10^{12}$  o más partículas de virión por ml mediante infusión u otra vía

35 adecuada. Los nanotransportadores de la invención pueden

usarse para el suministro específico de compuestos citotóxicos tales como clodronato, toxina del ántrax, exotoxina de *Pseudomonas*, normalmente modificados de modo que estos restos citotóxicos no se unen a células normales, y otras toxinas o agentes citotóxicos incluyendo agentes quimioterápicos reconocidos en la técnica tales como adrenocorticoides, agentes alquilantes, antiandrógenos, antiestrógenos, andrógenos, estrógenos, antimetabolitos tales como arabinósido de citosina, análogos de purina, análogos de pirimidina, y metotrexato, busulfán, carboplatino, clorambucilo, cisplatino y otros compuestos de platino, tamoxifeno, taxol, ciclofosfamida, alcaloides vegetales, prednisona, hidroxiaurea, tenipósido, y bleomicina, mostazas nitrogenadas, nitrosureas, vincristina, vinblastina, inhibidores de MEK cinasa, inhibidores de la ruta de MAP cinasa, inhibidores de PI-3-cinasa, perturbadores mitocondriales, inhibidores de la ruta de NFkB, inhibidores de proteosomas, agentes proapoptóticos, glucocorticoides, tales como prednisolona, flumetasona, dexametasona y betametasona, indometacina, diclofenaco, proteínas tales como fitolaca, saporina, momordina y gelonina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la síntesis de proteínas, didemnina B, verrucarina A, geldanamicina, y similares.

La terapia adenoviral usando los adenovirus de la presente invención puede combinarse con un tratamiento simultáneo o secuencial con otros protocolos antineoplásicos, tales como radioterapia, quimioterapia convencional para tratar un cáncer particular. Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados útiles para la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, actinomicina D, 1-deshidro-testosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaina, lidocaína, propranolol y puromicina,

antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, 5 tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (antiguamente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (antiguamente daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, caliqueamicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como cadena A de difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas), toxina ricina (tal como ricina A o una toxina de cadena de ricina A desglucosilada), toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-III), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertúsica, toxina tetánica, inhibidor de proteasas de Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, toxinas gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. Agentes terapéuticos, que pueden administrarse en combinación con un anticuerpo tal como se describe en otra parte en el presente documento, pueden ser también candidatos para restos terapéuticos útiles para la conjugación a un anticuerpo usado en la presente invención. Además, si el compuesto citotóxico es un polipéptido, éste incluye, sin limitación, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o

interferón-gamma o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), u otros factores de crecimiento y proteína de inducción de apoptosis aislada de mitocondrias.

La terapia adenoviral usando los adenovirus de la presente invención como vectores adenovirales puede combinarse también con otros genes que se sabe que son útiles en el tratamiento basado en virus. Véase la patente estadounidense n.º 5.648.478. En tales casos, el adenovirus quimérico comprende además un gen heterólogo que codifica para una proteína terapéutica, incorporado dentro del genoma viral, de manera que el gen heterólogo se expresa dentro de una célula infectada. Una proteína terapéutica, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que se esperaría que proporcionara algún beneficio terapéutico cuando se expresa en una célula dada. En una realización, el gen heterólogo es un gen activador de profármaco, tal como citosina desaminasa (CD) (véanse, patente estadounidense n.ºs 5.631.236; 5.358.866; y 5.677.178). En otras realizaciones, el gen heterólogo es un inductor conocido de la muerte celular, por ejemplo apoptina o proteína de muerte adenoviral (ADP), o una proteína de fusión, por ejemplo glicoproteína de membrana fusogénica (Danen-Van Oorschot *et al.* (1997) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94:5843-5847; Tollefson *et al.* (1996) *J. Virol.* 70:2296-2306; Fu *et al.* (2003) *Mol. Therapy* 7: 48-754, 2003; Ahmed *et al.* (2003) *Gene Therapy* 10:1663- 1671; Galanis *et al.* (2001) *Human Gene Therapy* 12(7): 811-821). Los ejemplos adicionales de genes heterólogos, o fragmentos de los mismos, incluyen aquéllos que codifican para proteínas inmunomoduladoras, tales como citocinas o quimiocinas. Los ejemplos incluyen interleucina 2, patentes estadounidenses n.ºs 4.738.927 o 5.641.665; interleucina 7, patentes estadounidenses n.ºs



4.965.195 o 5.328.988; e interleucina 12, patente  
estadounidense n.º 5.457.038; factor de necrosis tumoral alfa,  
patentes estadounidenses n.ºs 4.677.063 o 5.773.582;  
interferón gamma, patentes estadounidenses n.ºs 4.727.138 o  
5 4.762.791; o GM-CSF, patentes estadounidenses n.ºs 5.393.870 o  
5.391.485, Mackensen et al. (1997) Cytokine Growth Factor Rev.  
8:119-128). Las proteínas inmunomoduladoras adicionales  
incluyen además proteínas inflamatorias de macrófagos,  
incluyendo MIP-3. También puede usarse la proteína  
10 quimiotáctica de monocitos (MCP-3 alfa); una realización  
preferida de un gen heterólogo es un gen quimérico que  
consiste en un gen que codifica para una proteína que  
atraviesa membranas celulares, por ejemplo, VP22 o TAT,  
fusionado a un gen que codifica para una proteína que es  
15 preferiblemente tóxica para células cancerosas pero no para  
células normales.

Los adenovirus quiméricos de la invención pueden usarse  
también como vectores para suministrar genes que codifican  
para moléculas de ARN terapéuticamente útiles, es decir ARNip  
20 (Dorsett y Tuschl (2004) Nature Rev Drug Disc 3:318-329). En  
algunos casos, los genes pueden incorporarse en un adenovirus  
quimérico de la invención para potenciar adicionalmente la  
capacidad del virus oncolítico para desarraigar la célula del  
linaje de monocitos/macrófagos, aunque no tenga ningún impacto  
25 directo sobre la propia célula. Éstos incluyen genes que  
codifican para ARNip que pueden inhibir la actividad de  
factores que comprometen la presentación de CMH de clase I,  
complemento de bloque, inhiben IFN y mecanismos inducidos por  
IFN, quimiocinas y citocinas, destrucción basada en células  
30 NK, regulación por disminución de la respuesta inmunitaria  
(por ejemplo IL-10, TGF-Beta) y metaloproteasas que pueden  
descomponer la matriz extracelular y mejorar la propagación  
del virus dentro del tumor.

En una realización alternativa, la invención contempla  
35 el uso de los nanotransportadores de la invención para el

tratamiento de enfermedades asociadas con un aumento de la producción de IL-11 por células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, por monocitos CD14+. Una lista no exclusiva de enfermedades mediadas por IL-11 agudas y crónicas incluye, pero no se limita a, pancreatitis aguda; ELA; enfermedad de Alzheimer; caquexia/anorexia, incluyendo caquexia inducida por SIDA; asma y otras enfermedades pulmonares; aterosclerosis; vasculitis autoinmunitaria; síndrome de fatiga crónica; enfermedades asociadas a *Clostridium*, incluyendo diarrea asociada a *Clostridium*; indicaciones y estados coronarios, incluyendo insuficiencia cardiaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con septicemia) y revascularización coronaria; cáncer, tal como mieloma múltiple y leucemias mielógenas (por ejemplo, LMA y LMC) y otras leucemias, así como metástasis tumoral; diabetes (por ejemplo, diabetes insulínica); endometriosis; fiebre; fibromialgia; glomerulonefritis; enfermedad de injerto contra huésped/rechazo de trasplantes; choque hemorrágico; hiperalgesia; enfermedad inflamatoria del intestino; estados inflamatorios de una articulación, incluyendo artrosis, artritis psoriásica y artritis reumatoide (AR); enfermedad ocular inflamatoria, tal como puede estar asociada a, por ejemplo, trasplante de córnea; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedad de Kawasaki; deterioro del aprendizaje; enfermedades pulmonares (por ejemplo, SDRA); esclerosis múltiple; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteínas musculares, esp. en septicemia); neurotoxicidad (por ejemplo, tal como se induce mediante VIH); osteoporosis; dolor, incluyendo dolor relacionado con el cáncer; enfermedad de Parkinson; enfermedad del periodonto; parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; choque septicémico; efectos

secundarios de la radioterapia; enfermedad de la articulación temporomandibular; trastorno del sueño; uveítis; estados inflamatorios que resultan de distensión muscular, esguince, daño en cartílagos, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos patológicos.

5

En una realización alternativa, la invención contempla el uso de los nanotransportadores de la invención para el tratamiento de enfermedades asociadas con un aumento de la producción de TNF- $\alpha$  por células del linaje de monocitos-macrófagos y, en particular, por monocitos CD14+. Una lista no exclusiva de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de TNF- $\alpha$  incluye caquexia/anorexia; cáncer (por ejemplo, leucemias); síndrome de fatiga crónica; indicaciones y estados coronarios, incluyendo insuficiencia cardiaca congestiva, reestenosis coronaria, infarto de miocardio, disfunción miocárdica (por ejemplo, relacionada con septicemia) y revascularización coronaria; depresión; diabetes, incluyendo diabetes mellitus de tipo 1, de aparición en la juventud, y resistencia a la insulina (por ejemplo, tal como la asociada a la obesidad); endometriosis, endometritis y estados relacionados; fibromialgia o analgesia; rechazo de injerto contra huésped; hiperalgesia; enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn y diarrea asociada a *Clostridium difficile*; isquemia, incluyendo isquemia cerebral (lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedades pulmonares (por ejemplo, síndrome de deficiencia respiratoria del adulto, asma y fibrosis pulmonar); esclerosis múltiple; enfermedades neuroinflamatorias; enfermedades y estados oculares, incluyendo trasplante de córnea, degeneración ocular y uveítis; dolor, incluyendo dolor relacionado con el cáncer; pancreatitis; enfermedades del periodonto; pitiriasis rubra pilaris (PRP); prostatitis (bacteriana o no bacteriana) y

10

15

20

25

30

35

estados relacionados; psoriasis y estados relacionados; fibrosis pulmonar; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas, incluyendo artritis reumatoide, artrosis, artritis (reumatoide) juvenil, poliartritis seronegativa, 5 espondiloartritis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, esclerodermia, esclerosis sistémica, vasculitis (por ejemplo, enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis 10 ("septicémica") inducida por estafilococos, síndrome de Sjogren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de células gigantes); choque septicémico; efectos secundarios de la radioterapia; lupus eritematoso sistémico (LES); enfermedad de la articulación temporomandibular; tiroiditis; trasplante de tejido o un 15 estado inflamatorio que resulta de distensión muscular, esguince, daño en cartílagos, traumatismo, cirugía ortopédica, infección (por ejemplo, por VIH, *Clostridium difficile* y especies relacionadas) u otros procesos patológicos.

20 Se apreciará que pueden tratarse enfermedades asociadas con un aumento de la producción de IL-1 o TNF- $\alpha$  usando compuestos citotóxicos con el fin de reducir el número de monocitos viables o, alternativamente, es posible seleccionar como diana específicamente IL-1 o TNF- $\alpha$  usando compuestos que 25 pueden inhibir o reducir específicamente la síntesis de estas citocinas. Por tanto, los nanotransportadores de la invención pueden comprender inhibidores específicos de IL-1 y TNF- $\alpha$  tales como oligonucleótidos antisentido específicos de IL-1 o TNF- $\alpha$ , ribozimas, ARNip, aptámeros y similares o 30 polinucleótidos que codifican para dichos inhibidores. Se entenderá que si los nanotransportadores comprenden un polinucleótido que codifica para un compuesto inhibidor, estará idealmente bajo el control de un promotor específico de monocitos tal como el promotor de CD11b.

Los usos médicos de la invención contemplan el uso de cualquiera de los nanotransportadores mencionados anteriormente, incluyendo virus, una partícula de tipo viral, una nanopartícula o un armazón proteico que porta una proteína de fibra corta del subgrupo F de adenovirus tal como la proteína de fibra corta de Ad40 o la proteína de fibra corta de Ad41. En una realización aún más preferida, la partícula adenoviral es un Ad5 y la proteína de fibra corta es la proteína de fibra corta de Ad40.

En otra realización, los nanotransportadores de la invención se usan en el tratamiento de una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada frente a un producto dado. La enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada puede ser cualquier enfermedad en la que la respuesta inmunitaria es deficiente, en cuyo caso los nanotransportadores preferiblemente incorporan parte de o todo el antígeno para el que se desea una respuesta inmunitaria aumentada. Los antígenos adecuados que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen los antígenos mencionados anteriormente. En otra realización, los nanotransportadores pueden usarse para el tratamiento de estados caracterizados por un aumento de la respuesta inmunitaria. En este caso, los nanotransportadores pueden usarse para suministrar componentes citotóxicos a células del linaje de monocitos-macrófagos, disminuyendo de ese modo la respuesta inmunitaria global. Compuestos citotóxicos adecuados que pueden usarse para inhibir la proliferación de células del linaje de monocitos-macrófagos o monocitos CD14+ se han mencionado anteriormente en el contexto de composiciones para enfermedades asociadas a un aumento de la proliferación de células del linaje de monocitos-macrófagos.

La invención se describe mediante los siguientes ejemplos que han de interpretarse como simplemente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

**EJEMPLOS****MATERIALES Y MÉTODOS****Ad5/40 recombinantes**

5           Se obtuvieron Ad5/40 recombinantes sustituyendo toda la proteína de fibra de Ad5 por la fibra corta de Ad40 completa.

**Amplificación de virus**

10           Se hicieron crecer células HEK-293 (Q-BIOgene, Montreal, Canadá) en medio DMEM (n.º E15-810, laboratorios PAA, Linz, Austria) y el 10% de suero bovino fetal (SBF) (laboratorios PAA, Linz, Austria).

15           Se amplificaron secuencialmente disoluciones madre de virus en una placa de 10 cm ( $10^7$  células) y en veinte placas de 15 cm ( $5 \times 10^8$  células) durante de 36 h (Ad5) a 60 horas (Ad5/40) o hasta que se observó efecto citopático. Las etapas de amplificación totales duraron 7-10 días para vectores de Ad5, y 30-45 días para vectores de Ad5/40.

20           En todos los casos, en la etapa de amplificación final, se concentró el sedimento celular hasta un volumen final de 40-45 ml, y se realizaron tres rondas de congelación/descongelación para liberar partículas de virus. Se centrifugó el sobrenadante en dos gradientes de CsCl consecutivos [(a) gradiente escalonado de  $1,40 \text{ g/cm}^3$  -  $1,25 \text{ g/cm}^3$ ; y (b) un gradiente isopícnico de  $1,35 \text{ g/cm}^3$ ] para purificar partículas virales y se desalinizó usando una columna de desalinización PD-10 de Sephadex (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para eliminar el CsCl.

30           Se valoraron las disoluciones madre virales purificadas finales determinando su concentración (partículas/ml) mediante la densidad óptica a 260 nm (1 unidad de  $\text{DO}_{260} = 1,1 \times 10^{12}$  partículas/ml), y se midió su infectividad (unidades infecciosas/ml) mediante ensayo de dilución de punto final. En resumen, se realizaron ensayos de dilución de punto final por triplicado infectando 293 células con vectores diluidos en

35

serie, y contando luego el número de células que expresan el transgén (GFP o  $\beta$ gal) tras 24 h (Alba et al). La razón de partículas con respecto a unidad infecciosa de adenovirus usada en los experimentos tenía un promedio de 15:1 para Ad5 y de 100:1 a 500:1 para Ad5/40.

Se analizaron todos los vectores producidos para someter a prueba la ausencia de contaminación por bacterias, hongos, levaduras y micoplasmas.

### **Cultivo y líneas celulares**

Se hizo crecer la línea celular de ratón de monocitos-macrófagos RAW 264.7 en DMEM (n.º 41965, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 10% de FBS (n.º 10106-169, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 2% de disolución de penicilina-estreptomicina (Pen/Strep) (n.º 15070-063, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU). Se hicieron crecer las líneas celulares U-937 y THP-1 de monocitos humanas en RPMI 1640 (n.º 21875-034, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 10% de FBS + el 2% de Pen/Strep.

### **Transducción de líneas celulares**

Se hicieron crecer las líneas celulares de monocitos humanas THP-1 y U-937 en ausencia de cualquier factor de diferenciación, tal como LPS, PMA, etc., para evitar la unión de células al sustrato y la diferenciación de las células en un fenotipo de macrófago. Para el análisis de transducción de THP-1 y U-937, se recogieron células expandidas en cultivo y se contaron las células viables usando el método de exclusión de azul tripano. Entonces se sembraron las células en medio de infección: DMEM + el 2% de FBS + el 1% de NEAA (n.º 11140, Gibco Invitrogen Ltd, Paisley, RU) + el 2% de Pen/Strep a una densidad de 750.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después de sembrar, se añadieron al cultivo 100  $\mu$ l de medio de infección o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5/40 o

100  $\mu$ l de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector Ad5.

5 Para la transducción de la línea celular RAW 264.7 adherente de ratón, se separaron las células expandidas en cultivo del sustrato usando un rascador de células y se contaron las células viables tal como se describió anteriormente. Entonces se sembraron las células en medio de crecimiento a una densidad de 750.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se dejó que se unieran durante 24 h. 10 Tras la unión de las células, se sustituyó el medio de crecimiento por medio de infección y se añadieron al cultivo 100  $\mu$ l de medio de infección o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5/40 o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5. 15

Entonces se agitaron suavemente las placas para distribuir uniformemente el vector adenoviral en el cultivo. Se incubaron todas las placas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se monitorizó la expresión de GFP cada 24 h en un microscopio de fluorescencia invertido. 20

#### **Análisis de citometría de flujo de las líneas celulares**

25 Dos días tras la transducción, se recogieron las células sobrenadantes de THP-1 y U-937 y se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 ml. Entonces se centrifugaron las células a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se lavaron las células con 1 ml de 1 X PBS y se centrifugaron los tubos de nuevo a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró con cuidado la fracción de sobrenadante y se suspendió el sedimento celular 30 en 300  $\mu$ l de 1 X PBS + el 2% de formaldehído.

Se recogieron las células de la línea celular adherente RAW 264.7 raspando las células dos días tras la transducción y



se procesaron tal como se describió anteriormente para THP-1 y U-937.

Se analizaron las líneas celulares mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACSCANTO II (RAW 264.7 y U-937) y un citómetro de flujo BD FACSCalibur (THP-1)

**Aislamiento y cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas**

Se centrifugaron cuarenta y cinco ml de sangre obtenida de capas leucocitarias de donantes humanos sanos a 300 X g durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se retiró la fracción de plasma y se reestableció el volumen total mediante la adición de 1 X PBS + el 0,5% de FBS. Se repitió esta etapa de lavado una vez más. Tras terminar las etapas de lavado, se diluyó la sangre 1:1 con 1 X PBS + el 0,5% de FBS. Se colocaron treinta mililitros de sangre diluida sobre 15 ml de Lymphoprep (n.º 1114544, AXIS-SHIELD PoC AS, Oslo, Noruega) en un tubo de centrifuga de 50 ml. Entonces se centrifugó la sangre a 800 X g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se fijaron los tubos en un soporte metálico y se retiró cuidadosamente la capa de PBMC usando una punta de filtro de 1,250 ml estéril extra-larga sujeta a una pipeta de 1 ml. Se colocaron las PBMC recuperadas en un tubo de centrifuga de 50 ml y se diluyeron con 1 X PBS hasta un volumen final de 45 ml. Entonces se invirtieron los tubos para lavar las células. Entonces se centrifugaron las PBMC diluidas a 400 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se desechó la fracción de sobrenadante sin perturbar el sedimento celular. Se repitió una vez más esta etapa de lavado, pero esta vez se dejó en el tubo un volumen de 2-3 ml de la fracción de sobrenadante. Se suspendieron las PBMC en este volumen y se diluyeron 20 µl de la suspensión celular 1:10 en 1 X PBS. Se diluyeron adicionalmente diez microlitros de esta dilución 1:1 con el colorante azul tripano (n.º T8154, SIGMA, Múnich, Alemania). Se contaron las células viables en un

hemocitómetro Neubauer bajo un microscopio invertido usando un filtro de contraste de fases (x 100). Se contaron las células viables de cuatro cuadrados diferentes de 1 mm cuadrado de área y se calculó la media aritmética. Se usó esta media para calcular la concentración celular (células/ml) en la disolución de PBMC y luego se diluyeron las células en medio de infección: DMEM + el 2% de FBS + el 1% de NEAA + el 2% de Pen/Strep hasta obtener una concentración final de 1.034.483 células/ml. Tras la dilución, se contaron las células de nuevo tal como se indicó anteriormente para determinar que la concentración celular se encontraba entre un intervalo de desde 1.006.897 hasta 1.062.069 células/ml. Se sembraron setecientos cincuenta microlitros de la suspensión de PBMC por pocillo (750.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos.

#### **Anticuerpos**

Para el análisis de citotoxicidad se usaron anticuerpos contra células de monocito humanas: anticuerpo anti-CD14-APC (n.º 345787, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) para la determinación de células CD14+ junto con el colorante reactivo violeta-fluorescente (n.º L34955, Invitrogen Ltd, Paisley, RU) para la discriminación de células viables y no viables.

Para el análisis de especificidad de transducción se usó una disolución mixta de anticuerpos contra células humanas que contenía: anticuerpo anti-CD3-PerCP (n.º 345766, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), anticuerpo anti-CD16-PE (Leu-11c) (n.º 332779, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), anticuerpo anti-CD19-APC-Cy7 (n.º 348814, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), anticuerpo anti-CD56-PE (n.º 345810, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) y anticuerpo anti-CD14-APC (n.º 345787, BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica).

#### **Análisis de citotoxicidad**

Se sembraron setecientos cincuenta microlitros de PBMC por pocillo (750.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos.

Inmediatamente después de sembrar, se añadieron al cultivo 100  $\mu$ l de medio de infección o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía diferentes cantidades de partículas físicas del vector de Ad5/40 o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía diferentes cantidades de partículas físicas del vector de Ad5. Se agitaron suavemente las placas para distribuir uniformemente el vector adenoviral en el cultivo. Se incubaron todas las placas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se monitorizó la expresión de GFP cada 24 h en un microscopio de fluorescencia invertido.

#### **Análisis de especificidad de transducción**

Se sembraron setecientos cincuenta microlitros de PBMC por pocillo (750.000 células/pocillo) en placas de 6 pocillos. Inmediatamente después de sembrar, se añadieron al cultivo de PBMC 100  $\mu$ l de medio de infección o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5/40 o 100  $\mu$ l de medio de infección que contenía 250 partículas físicas/célula del vector de Ad5. Se agitaron suavemente las placas para distribuir uniformemente el vector adenoviral en el cultivo. Se incubaron todas las placas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y se monitorizó la expresión de GFP cada 24 h en un microscopio de fluorescencia invertido.

#### **Análisis de citometría de flujo de PBMC**

Dos días tras la transducción, se recogieron las PBMC sobrenadantes y se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 ml. Entonces se centrifugaron las células a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retiró con cuidado el sobrenadante y se suspendió el sedimento celular en 100  $\mu$ l de una disolución de 1 X PBS que contenía los anticuerpos correspondientes. Entonces se incubaron los tubos que contenían las PBMC suspendidas en esta disolución durante 15-20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se añadió 1 ml de 1 X PBS a cada tubo y se centrifugaron los tubos a 1000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se retiró con cuidado el sobrenadante y se suspendió el sedimento celular en 300 µl de 1 X PBS + el 2% de formaldehído. Entonces se analizaron las poblaciones celulares en un citómetro de flujo BD FACSCANTO II.

#### EJEMPLO 1

##### Ad5/40 puede transfectar macrófagos de ratón de la mucosa intestinal

Se administraron Ad5/40-GFP recombinantes por vía oral y por vía intrarrectal a ratones. Se observó fluorescencia verde al nivel de la submucosa en secciones de tejido intestinal. Puesto que la presencia de macrófagos residentes en esta zona es común incluso en animales sanos, se decidió evaluar si Ad5/40 podía transfectar de manera eficaz líneas celulares de macrófagos de ratón. Se cultivaron células de RAW 264.7 y se infectaron con Ad5/40-GFP a 250 partículas físicas/célula (figura 1). De manera interesante, la eficacia de infección era claramente mayor que la de Ad5 en las mismas condiciones. Por tanto, los resultados confirmaron que Ad5/40 podía transfectar de manera eficaz macrófagos de ratón.

#### EJEMPLO 2

##### Ad5/40 puede transfectar macrófagos derivados de monocitos humanos

A continuación se sometió a prueba la capacidad de Ad5/40 para transfectar de manera eficaz macrófagos derivados de monocitos humanos. Para este fin, se cultivaron células THP1 (buena efectividad usando Ad5) y U-937 (infectividad muy baja usando Ad5) en ausencia de cualquier factor de diferenciación que pudiera inducir la maduración de monocitos en macrófagos (tal como LPS, PMA, etc.). En esta fase, se cambió el medio de cultivo a medio de infección y se añadieron

250 partículas físicas/célula de Ad5/40-GFP o 250 partículas físicas/célula de Ad5-GFP. El análisis de citometría de flujo de la fracción de sobrenadante de los diferentes cultivos reveló un mayor porcentaje de células transducidas y una mayor expresión de GFP en los cultivos infectados por el vector de Ad5/40 tras 48 h, confirmando así la eficacia superior de este vector en la transfección de líneas celulares de monocitos humanas (figura 2).

#### 10 EJEMPLO 3

##### Ad5/40 puede transfectar monocitos de sangre periférica

A continuación, se sometió a prueba si Ad5/40 podía transfectar monocitos de sangre periférica. Para este fin, se obtuvieron células mononucleares (es decir, linfocitos, monocitos y células NK) obtenidas a partir de capas leucocitarias de sangre de donante humano sano. De manera interesante, el Ad5/40 pudo infectar selectivamente monocitos de sangre periférica, a pesar del hecho de que representan en promedio sólo el 8% de las células sanguíneas mononucleares totales (figura 3). De hecho, a una dosis de 250 partículas físicas por célula, la infección no es sólo más eficaz en el caso de Ad5/40 en comparación con Ad5 (el 66% frente al 15%) (figura 4), sino que también era extremadamente selectiva ya que más del Ad5/40 infectó exclusivamente el 99,9% de las células CD14+ (monocitos).

#### EJEMPLO 4

##### La transducción de monocitos mediante Ad5/40 depende exclusivamente de CD14 y no de CD16

Con el fin de caracterizar mejor las diferencias en la infectividad entre Ad5 y Ad5/40, se usaron condiciones de carga viral de no saturación (250 partículas virales por célula sanguínea). Sin embargo, en estas condiciones es posible determinar si cualquiera de las subpoblaciones de monocitos, tales como CD14+/CD16+ proinflamatorios frente a

CD14+/CD16- clásicos está infectada selectivamente. Tal como se muestra en la figura 5, la infectividad de Ad5/40 no está asociada con la expresión de CD16: Ad5 ( $15 \pm 2\%$  frente al  $17\% \pm 3$ ); Ad5/40 ( $67\% \pm 3$  frente al  $66\% \pm 2$ ). Éste es un punto importante porque ambas poblaciones CD14+/CD16 tienen importantes aplicaciones terapéuticas y, por tanto, la capacidad de Ad5/40 para infectar eficazmente los dos subconjuntos de monocitos de sangre periférica implica un gran potencial de Ad5/40 como herramienta para la transferencia génica específica de célula.

Un análisis más detallado de la infectividad de Ad5/40 en células CD14+/CD16- y CD14+/CD16+ muestra que el nivel de expresión transgénica por célula infectada es significativamente superior (aproximadamente el 200%) para Ad5/40 que para el Ad5 (figura 6), lo que junto con los porcentajes de células infectadas significa que la cantidad de proteína expresada es aproximadamente 10 veces superior para Ad5/40 que para el Ad5 (figura 7). En ambos casos, la expresión de GFP es ligeramente superior en monocitos (CD14+/CD16+), aunque no hay diferencias significativas en comparación con monocitos (CD14 +/CD16-) clásicos.

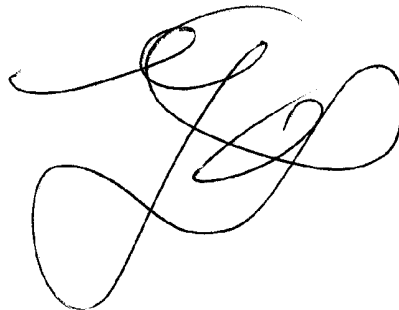
#### EJEMPLO 5

La transducción de células CD14+ mediante Ad5/40 no da como resultado una pérdida significativa de viabilidad celular

Para someter a prueba la citotoxicidad relativa de Ad5/40 frente a Ad5, se realizó un experimento de dosis-respuesta. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica humana con dosis virales crecientes. Tal como se muestra en la figura 8, en todas las condiciones sometidas a prueba, Ad5/40 es claramente más eficaz en la infección de células CD14+ que Ad5. Por tanto, la infectividad de Ad5/40 forma una meseta cuando casi el 90% de los monocitos totales se infectan, mientras que para Ad5, no se observa saturación incluso a dosis muy altas (2500 partículas físicas por

célula). El análisis de las dos curvas de dosis:respuesta muestra que Ad5/40 es aproximadamente 25-50 veces más eficaz para la transferencia génica a células CD14+ que Ad5, puesto que para infectar un 33% de monocitos se necesita una dosis de 2500 partículas de Ad5 por célula, mientras que son suficientes dosis de 50-100 partículas de Ad5/40 por célula para igualar este nivel de infección. La dosis de Ad5/40 usada en la mayoría de los experimentos (250 partículas por célula) está justo por debajo de la fase de saturación o meseta.

La baja eficacia de Ad5 para infectar células CD14+ podría explicar porqué en las condiciones más altas usadas (2500 partículas por célula) la viabilidad de células CD14+ apenas se ve afectada. Por el contrario, Ad5/40 a dosis altas (1000 y 2500 partículas virales por célula) está asociado con una disminución en la viabilidad de células CD14+, probablemente debido a la citotoxicidad provocada por la alta carga viral (figura 9).



**REIVINDICACIONES**

1. Nanotransportador que comprende al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo con la condición de que el nanotransportador no sea una partícula adenoviral.
2. Nanotransportador según la reivindicación 1, en el que la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F es la proteína de fibra corta de Ad40.
3. Nanotransportador según las reivindicaciones 1 ó 2, seleccionándose el nanotransportador del grupo de un virus, una partícula de tipo viral, una nanopartícula o un armazón proteico.
4. Procedimiento *in vitro* para suministrar un compuesto de interés a una célula del linaje de monocitos-macrófagos que comprende poner en contacto dicha célula con un nanotransportador que porta dicho compuesto de interés y en el que el transportador contiene al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F es la proteína de fibra corta de Ad40.
6. Método según la reivindicación 5, en el que el nanotransportador se selecciona del grupo de un virus, una partícula de tipo viral, una nanopartícula o un armazón proteico.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el nanotransportador es una partícula adenoviral, preferiblemente un Ad5.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que la célula del linaje de monocitos-macrófagos es una célula sanguínea mononuclear primaria o una célula dendrítica derivada de monocito.



9. Nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en medicina.
- 5 10. Nanotransportador que comprende un producto de interés y al menos una parte de la proteína de fibra corta de un adenovirus del subgrupo F o una variante funcionalmente equivalente del mismo para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos.
- 10 11. Nanotransportador según la reivindicación 10, en el que la enfermedad asociada a células del linaje de monocitos-macrófagos se selecciona del grupo de
- 15 (i) una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria alterada,
- (ii) una enfermedad inflamatoria y
- (iii) una enfermedad caracterizada por una proliferación no deseada de una célula del linaje de monocitos-macrófagos.
- 20 12. Nanotransportador según las reivindicaciones 10 u 11, en el que la proteína de fibra corta de un adenovirus del grupo F es la proteína de fibra corta de Ad40.
13. Nanotransportador según la reivindicación 12, seleccionándose el nanotransportador del grupo de un
- 25 virus, una partícula de tipo viral, una nanopartícula o un armazón proteico.
14. Nanotransportador según la reivindicación 13, siendo el nanotransportador una partícula adenoviral, preferiblemente una partícula adenoviral Ad5.
- 30 15. Nanotransportador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que la célula del linaje de monocitos-macrófagos es una célula sanguínea mononuclear primaria o una célula dendrítica derivada de monocito.

16. Nanotransportador según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el producto de interés se selecciona del grupo de:

5

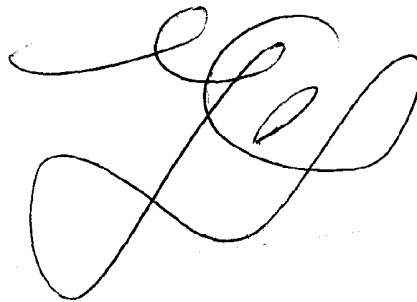
(i) un compuesto citotóxico cuando la enfermedad es o bien una enfermedad caracterizada por un aumento de la respuesta inmunitaria hacia un antígeno o una enfermedad caracterizada por una proliferación no deseada de una célula del linaje de monocitos-macrófagos, en particular, una mononucleosis,

10

(ii) compuesto antiinflamatorio cuando la enfermedad es una enfermedad inflamatoria y

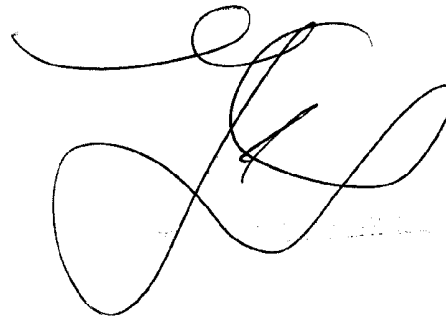
15

(iii) un compuesto inmunogénico cuando la enfermedad es una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunitaria deficiente contra dicho compuesto inmunogénico.



**RESUMEN**

La presente invención proporciona un vector útil y bioseguro para transferir material genético a células mononucleares CD14+ (monocitos y macrófagos derivados de monocitos) de una manera eficaz y específica. La realización de la invención hace uso de los vectores de adenovirus 5 humano quimérico que portan la fibra corta de Ad40 enterotrópico para transferir material genético a las células mononucleares CD14+ diana.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and flourishes, positioned in the lower right quadrant of the page.

5

10

**RAW 264.7**

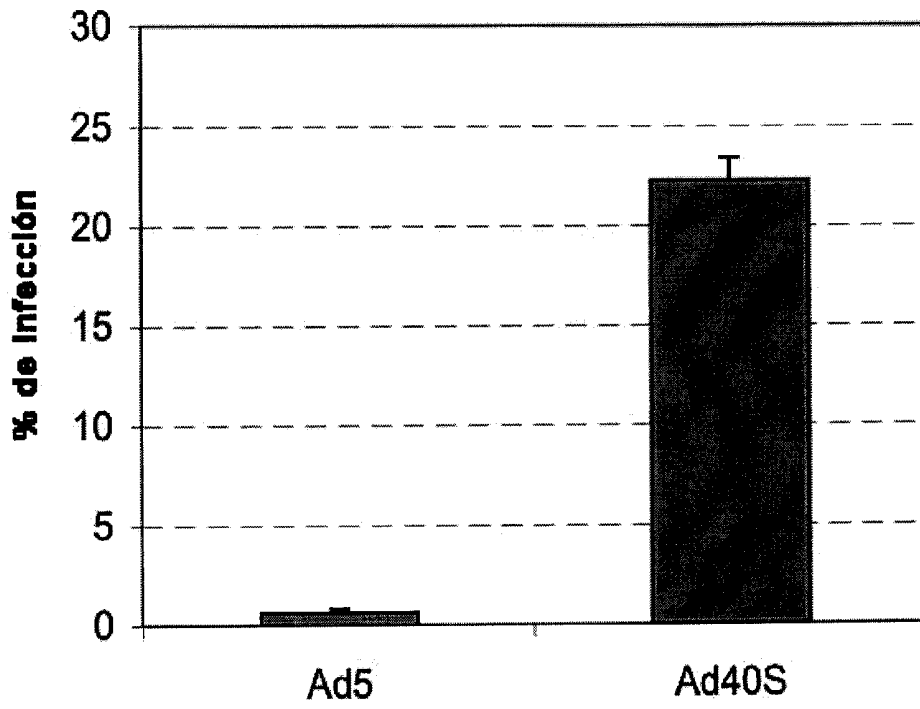


FIGURA 1

A large, handwritten signature or scribble in black ink, located in the lower right quadrant of the page. The signature is highly stylized and illegible.

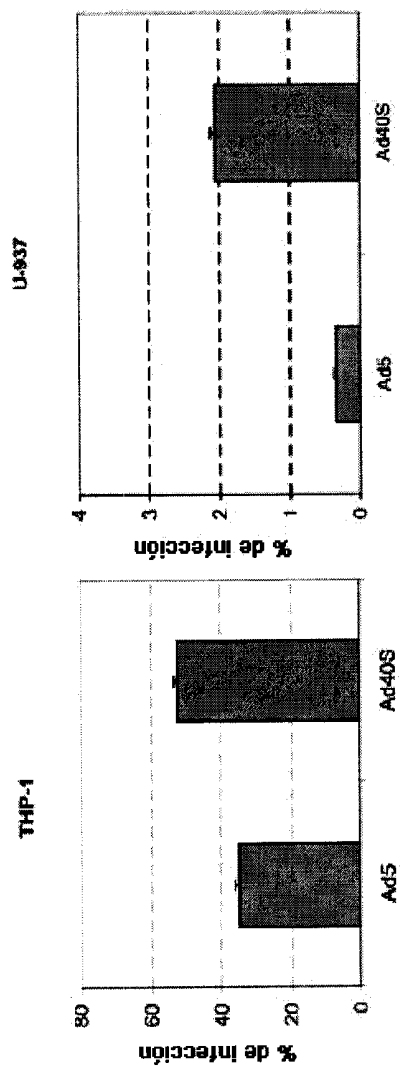


FIGURA 2

A large, handwritten signature or scribble in black ink, located at the bottom of the page.

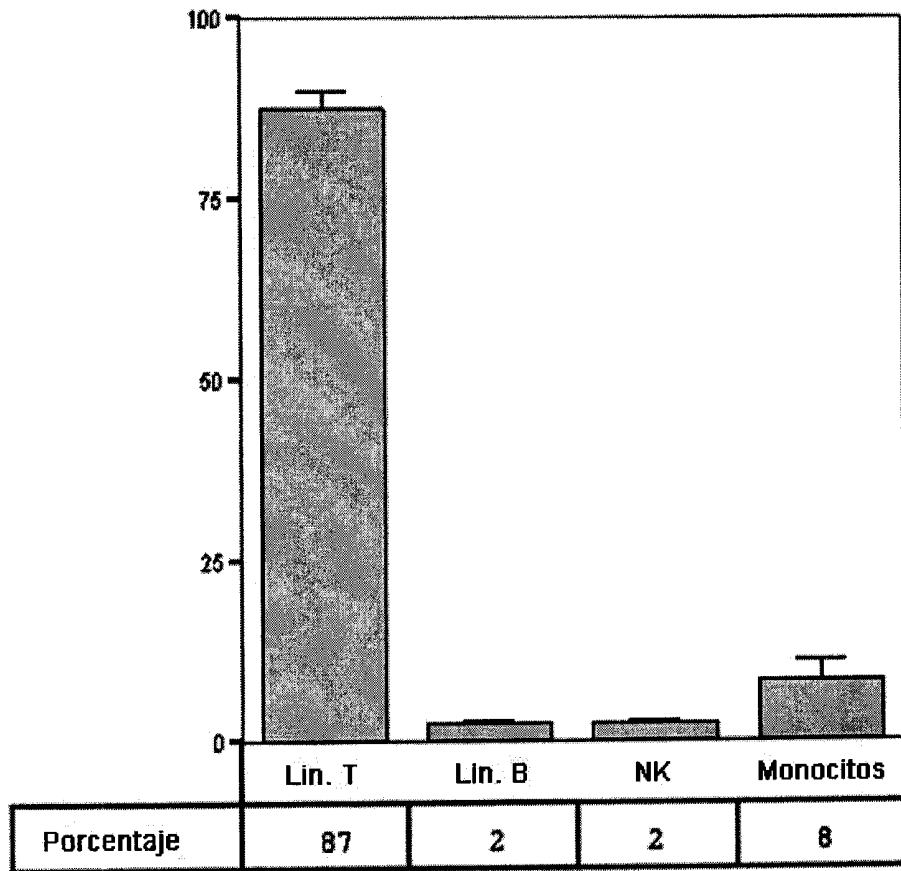
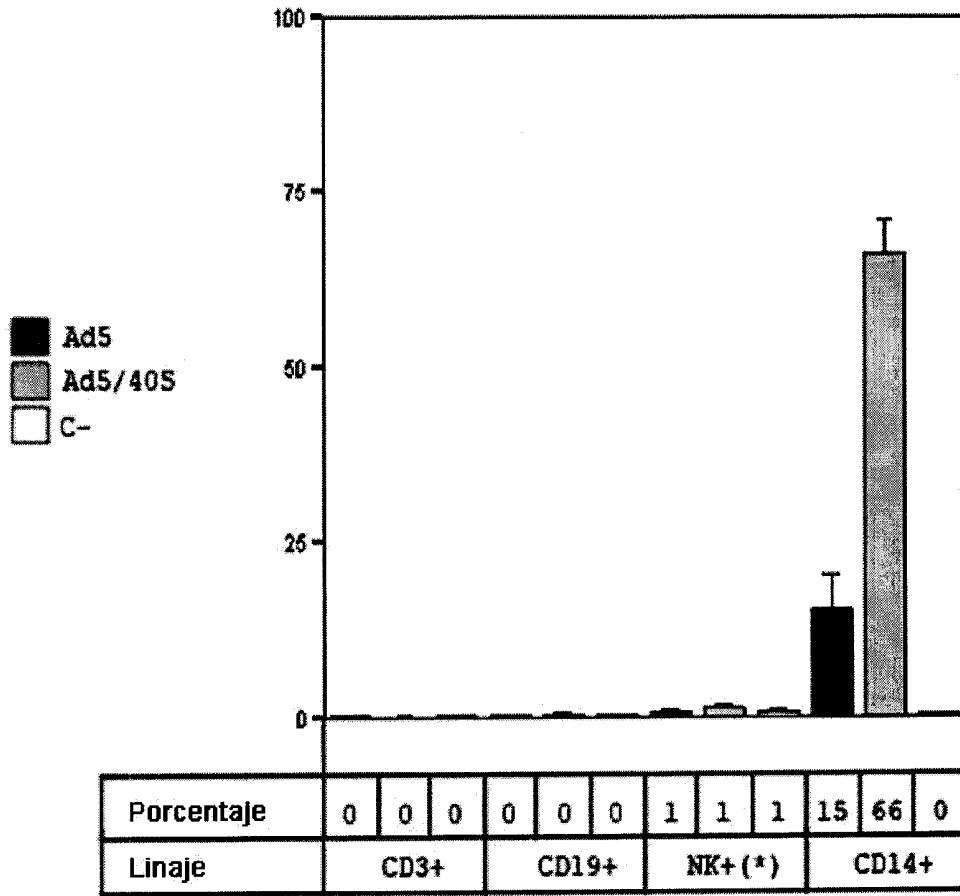


FIGURA 3

A handwritten signature or scribble, possibly a name, written in black ink. It consists of several loops and curves, making it difficult to decipher. It is located in the lower right quadrant of the page.



(\*) Células NK positivas definidas como CD56+ CD16+ CD3-

FIGURA 4

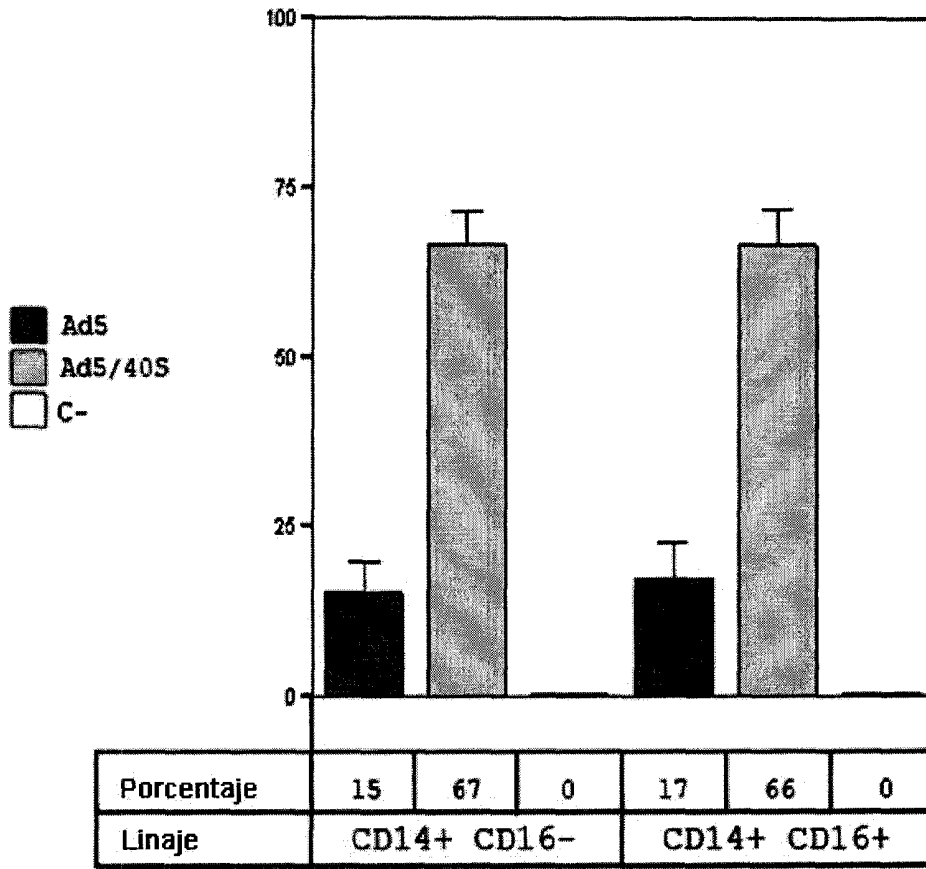


FIGURA 5

*[Handwritten signature]*

Dr. [Name]



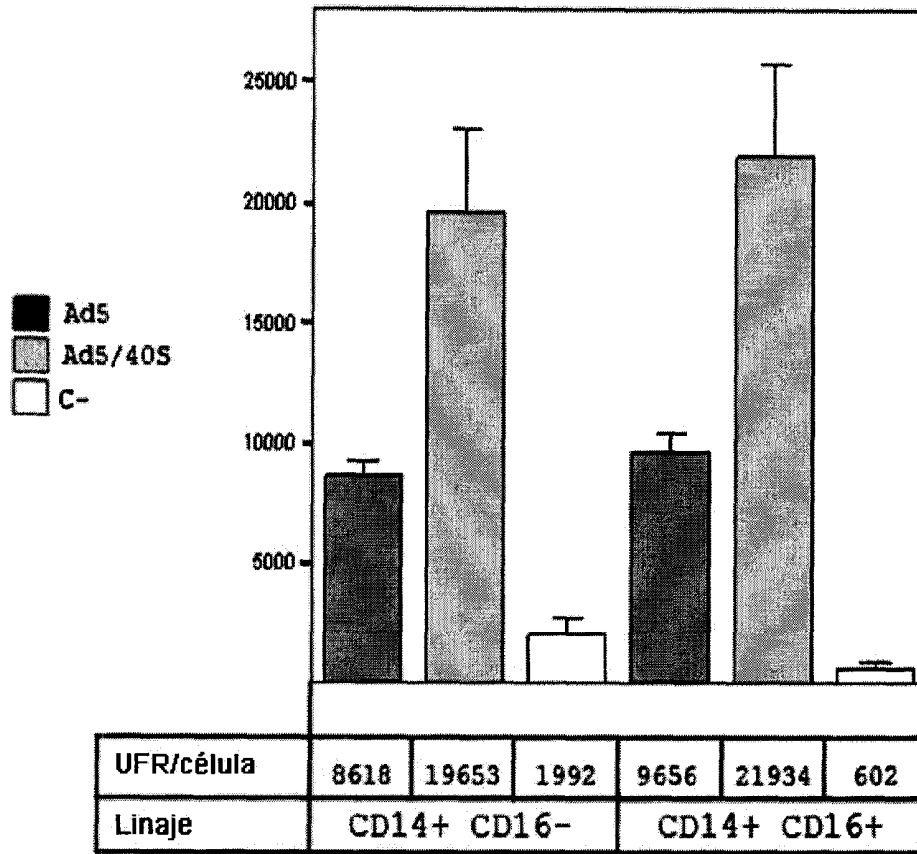


FIGURA 6

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

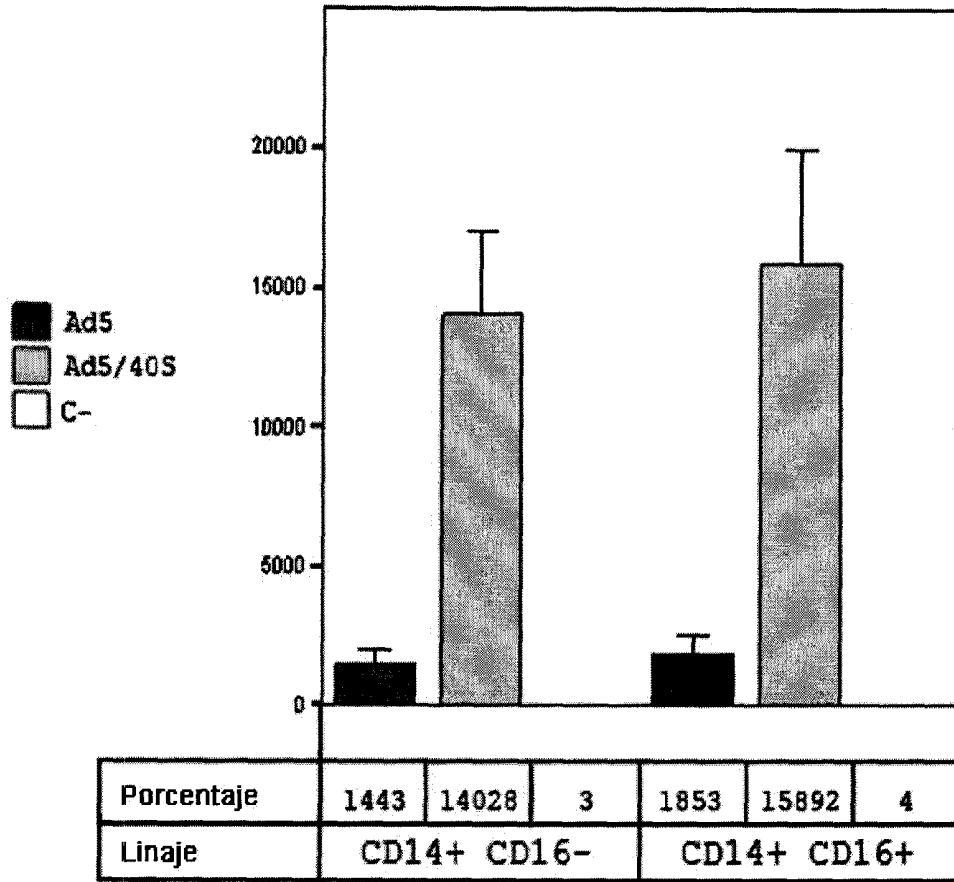


FIGURA 7

*[Handwritten signature]*  
 DR. JUAN CARLOS ESCOBAR (CA)

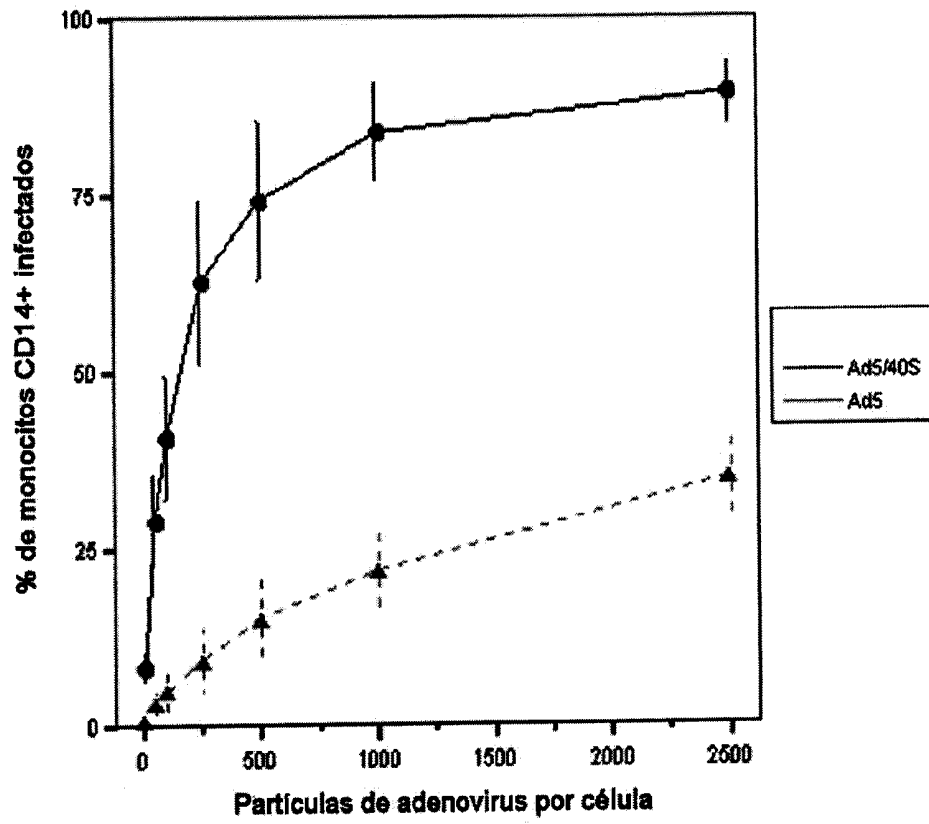


FIGURA 8

CELIA D. BARRERA (M)

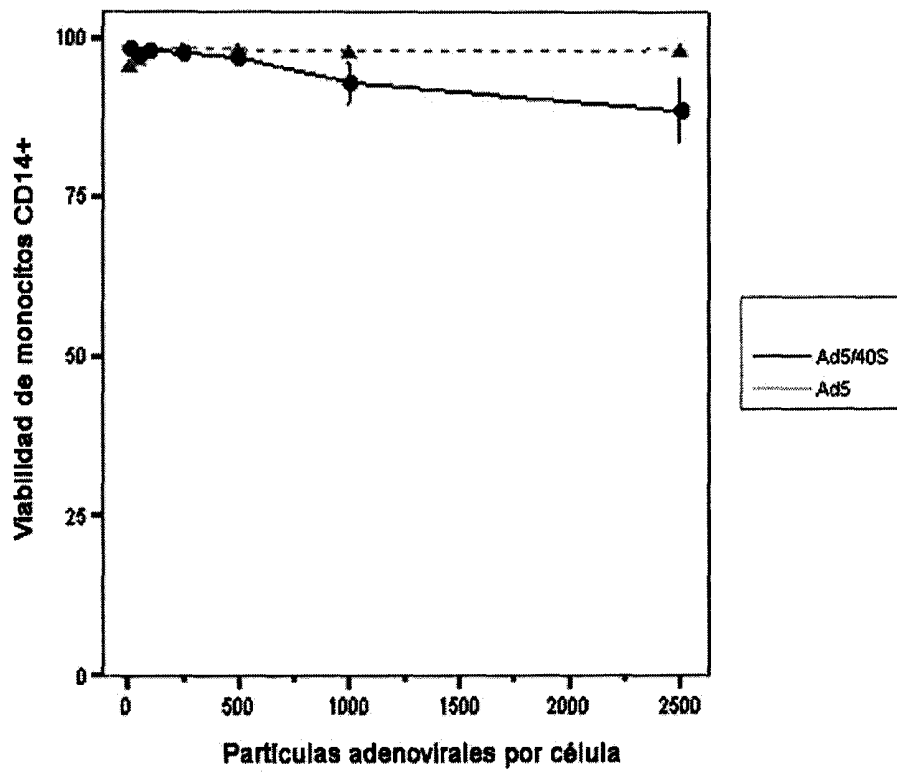


FIGURA 9

GUSTAVO PACHECO (81)

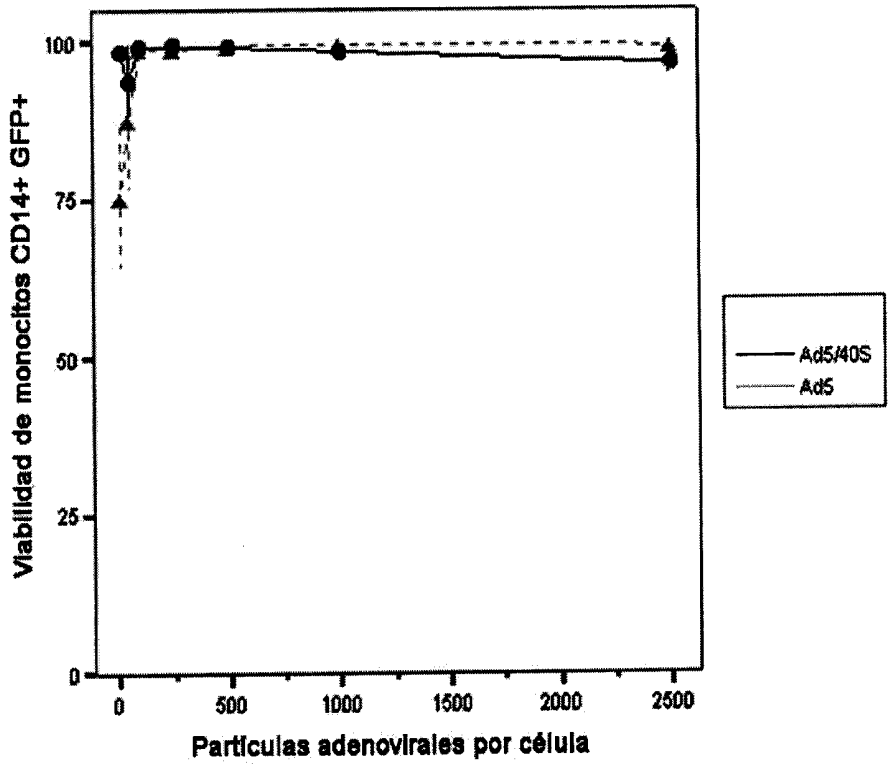


FIGURA 10

ALVARO BARRERA

## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA  
 FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUCIÓ CATALANA DE RECERCA I  
 ESTUDIS AVANÇATS  
 GRIFOLS, S.A.  
 FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ EN CIÈNCIES DE LA  
 SALUT GERMANS TRIAS I PUJOL
- 10 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA UNA TRANSFERENCIA GÉNICA EFICAZ  
 Y DIRIGIDA A MONOCITOS Y MACRÓFAGOS
- <130> P4401UY00
- 15 <150> EP09159001.8  
 <151> 2009-04-29
- <160> 2
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
 <211> 387  
 <212> PRT
- 25 <213> Adenovirus del subgrupo F 40
- <400> 1
- 30 Met Lys Arg Thr Arg Ile Glu Asp Asp Phe Asn Pro Val Tyr Pro Tyr  
 1 5 10 15
- Asp Thr Ser Ser Thr Pro Ser Ile Pro Tyr Val Ala Pro Pro Phe Val  
 20 25 30
- 35

Ser Ser Asp Gly Leu Gln Glu Asn Pro Pro Gly Val Leu Ala Leu Lys  
 35 40 45

5 Tyr Thr Asp Pro Ile Thr Thr Asn Ala Lys His Glu Leu Thr Leu Lys  
 50 55 60

10 Leu Gly Ser Asn Ile Thr Leu Gln Asn Gly Leu Leu Ser Ala Thr Val  
 65 70 75 80

15 Pro Thr Val Ser Pro Pro Leu Thr Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Leu  
 85 90 95

Ala Thr Ser Ala Pro Ile Ala Val Ser Ala Asn Ser Leu Thr Leu Ala  
 100 105 110

20 Thr Ala Ala Pro Leu Thr Val Ser Asn Asn Gln Leu Ser Ile Asn Thr  
 115 120 125

25 Gly Arg Gly Leu Val Ile Thr Asn Asn Ala Val Ala Val Asn Pro Thr  
 130 135 140

30 Gly Ala Leu Gly Phe Asn Asn Thr Gly Ala Leu Gln Leu Asn Ala Ala  
 145 150 155 160

Gly Gly Met Arg Val Asp Gly Ala Asn Leu Ile Leu His Val Ala Tyr  
 165 170 175

35 Pro Phe Glu Ala Ile Asn Gln Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asn Gly Leu  
 180 185 190

Glu Val Thr Asn Gly Gly Lys Leu Asn Val Lys Leu Gly Ser Gly Leu  
 195 200 205  
 5

Gln Phe Asp Asn Asn Gly Arg Ile Thr Ile Ser Asn Arg Ile Gln Thr  
 210 215 220

10

Arg Gly Val Thr Ser Leu Thr Thr Ile Trp Ser Ile Ser Pro Thr Pro  
 225 230 235 240

15

Asn Cys Ser Ile Tyr Glu Thr Gln Asp Ala Asn Leu Phe Leu Cys Leu  
 245 250 255

20

Thr Lys Asn Gly Ala His Val Leu Gly Thr Ile Thr Ile Lys Gly Leu  
 260 265 270

25

Lys Gly Ala Leu Arg Glu Met Asn Asp Asn Ala Leu Ser Val Lys Leu  
 275 280 285

30

Pro Phe Asp Asn Gln Gly Asn Leu Leu Asn Cys Ala Leu Glu Ser Ser  
 290 295 300

35

Thr Trp Arg Tyr Gln Glu Thr Asn Ala Val Ala Ser Asn Ala Leu Thr  
 305 310 315 320

Phe Met Pro Asn Ser Thr Val Tyr Pro Arg Asn Lys Thr Ala Asp Pro  
 325 330 335



Gly Asn Met Leu Ile Gln Ile Ser Pro Asn Ile Thr Phe Ser Val Val  
 340 345 350

5 Tyr Asn Glu Ile Asn Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Phe Lys Trp Ser Ala  
 355 360 365

10 Glu Pro Gly Lys Pro Phe His Pro Pro Thr Ala Val Phe Cys Tyr Ile  
 370 375 380

Thr Glu Gln  
 385

15

<210> 2

<211> 387

<212> PRT

<213> Adenovirus del subgrupo F 41

20

<400> 2

Met Lys Arg Thr Arg Ile Glu Asp Asp Phe Asn Pro Val Tyr Pro Tyr  
 1 5 10 15

25

Asp Thr Phe Ser Thr Pro Ser Ile Pro Tyr Val Ala Pro Pro Phe Val  
 20 25 30

30

Ser Ser Asp Gly Leu Gln Glu Lys Pro Pro Gly Val Leu Ala Leu Lys  
 35 40 45

35

Tyr Thr Asp Pro Ile Thr Thr Asn Ala Lys His Glu Leu Thr Leu Lys  
 50 55 60

Leu Gly Ser Asn Ile Thr Leu Glu Asn Gly Leu Leu Ser Ala Thr Val  
 65 70 75 80

5 Pro Thr Val Ser Pro Pro Leu Thr Asn Ser Asn Asn Ser Leu Gly Leu  
 85 90 95

10 Ala Thr Ser Ala Pro Ile Ala Val Ser Ala Asn Ser Leu Thr Leu Ala  
 100 105 110

15 Thr Ala Ala Pro Leu Thr Val Ser Asn Asn Gln Leu Ser Ile Asn Ala  
 115 120 125

Gly Arg Gly Leu Val Ile Thr Asn Asn Ala Leu Thr Val Asn Pro Thr  
 130 135 140

20 Gly Ala Leu Gly Phe Asn Asn Thr Gly Ala Leu Gln Leu Asn Ala Ala  
 145 150 155 160

25 Gly Gly Met Arg Val Asp Gly Ala Asn Leu Ile Leu His Val Ala Tyr  
 165 170 175

30 Pro Phe Glu Ala Ile Asn Gln Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asn Gly Leu  
 180 185 190

Glu Val Thr Ser Gly Gly Lys Leu Asn Val Lys Leu Gly Ser Gly Leu  
 195 200 205

35 Gln Phe Asp Ser Asn Gly Arg Ile Ala Ile Ser Asn Ser Asn Arg Thr  
 210 215 220

Arg Ser Val Pro Ser Leu Thr Thr Ile Trp Ser Ile Ser Pro Thr Pro  
 225                                    230                                    235                                    240  
 5

Asn Cys Ser Ile Tyr Glu Thr Gln Asp Ala Asn Leu Phe Leu Cys Leu  
    245                                    250                                    255

10

Thr Lys Asn Gly Ala His Val Leu Gly Thr Ile Thr Ile Lys Gly Leu  
    260                                    265                                    270

15

Lys Gly Ala Leu Arg Glu Met His Asp Asn Ala Leu Ser Leu Lys Leu  
    275                                    280                                    285

20

Pro Phe Asp Asn Gln Gly Asn Leu Leu Asn Cys Ala Leu Glu Ser Ser  
    290                                    295                                    300

25

Thr Trp Arg Tyr Gln Glu Thr Asn Ala Val Ala Ser Asn Ala Leu Thr  
 305                                    310                                    315                                    320

30

Phe Met Pro Asn Ser Thr Val Tyr Pro Arg Asn Lys Thr Ala His Pro  
    325                                    330                                    335

35

Gly Asn Met Leu Ile Gln Ile Ser Pro Asn Ile Thr Phe Ser Val Val  
    340                                    345                                    350

Tyr Asn Glu Ile Asn Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Phe Lys Trp Ser Ala  
    355                                    360                                    365

Glu Pro Gly Lys Pro Phe His Pro Pro Thr Ala Val Phe Cys Tyr Ile  
370 375 380

5 Thr Glu Gln  
385



GUSTAVO FISCHER (94)