

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 061**

51 Int. Cl.:
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/861 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05732404 .8**
96 Fecha de presentación: **15.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1749097**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

54 Título: **VIRUS DE REPLICACIÓN COMPETENTE CAPACES DE SILENCIAR LA EXPRESIÓN DE UN FACTOR DE INHIBICIÓN DE VIRUS.**

30 Prioridad:
15.04.2004 EP 04076154

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
**VERENIGING VOOR CHRISTELIJK HOGER
ONDERWIJS, WETENSCHAPPELIJK
ONDERZOEK EN PATIENTENZORG
DE BOELELAAN 1105
1081 HV AMSTERDAM, NL**

72 Inventor/es:
**CARETTE, Jan, Eduard y
VAN BEUSECHEM, Victor, Willem**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 375 061 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus de replicación competente capaces de silenciar la expresión de un factor de inhibición de virus.

5 **Sector de la invención.**

La presente invención se refiere a los sectores de la modificación genética, la biotecnología y la medicina. En particular, la presente invención da a conocer adenovirus recombinantes con potencia para lisar las células en las que éstos se replican y suprimir la expresión de uno o más genes diana en dichas células en las que éstos se replican. La presente invención da a conocer además adenovirus recombinantes que silencian la expresión de ciertos genes en determinadas células, lo que provoca que dichos virus se repliquen con más eficacia en dichas células y lisen las mismas. De este modo, la presente invención da a conocer medios más eficaces para erradicar ciertas poblaciones de células. La presente memoria descriptiva da a conocer además métodos y medios para identificar los genes diana cuyo silenciamiento hace que los virus se reproduzcan y lisen las células en las que se replican con mayor eficacia. La presente invención da a conocer además adenovirus recombinantes que silencian la expresión de genes diana identificados en dichas células, lo que provoca que dichos virus se repliquen con más eficacia en dichas células y lisen las mismas. La presente invención tiene aplicaciones útiles en las áreas de producción de vectores virales, la identificación de dianas terapéuticas y tratamientos médicos basados en la inhibición de la expresión de proteínas y la eliminación de ciertas células de un cuerpo, tal como por ejemplo las células cancerosas.

Antecedentes de la invención

Los virus recombinantes se generan a partir del genoma de virus mediante ingeniería genética. Esta ingeniería genética a menudo implica la inserción de ADN heterólogo en el genoma del adenovirus incluyendo, pero sin constituir limitación, ADN que codifica un producto terapéutico. Sin embargo, debe entenderse que el término virus recombinante pretende incluir además virus de los que se han eliminado partes del genoma del virus sin la inserción de ADN heterólogo. Otro ejemplo de un virus recombinante es un virus quimérico que contiene partes de los genomas de diferentes virus o de diferentes tipos del mismo virus tales como, por ejemplo, virus de serotipo diferente o virus con diferentes especificidades de especies animales huésped. A los efectos de la presente invención, se diferencian dos tipos de virus recombinantes, es decir, virus deficientes en replicación y virus competentes en replicación. La presente invención se refiere únicamente a virus competentes en replicación.

En la presente memoria descriptiva, el virus recombinante se ejemplifica por el adenovirus; por lo tanto, el término adenovirus puede reemplazarse por cualquier virus adecuado conocido en la técnica que es capaz de infectar y lisar células diana. Ejemplos que no constituyen limitación de otros virus adecuados son los virus del herpes simple y los virus vacuna. Además, debe entenderse que también en otros términos definidos en la presente memoria descriptiva que contiene el término adenovirus, tales como por ejemplo "factor inhibidor de adenovirus", el término adenovirus puede ser reemplazado por cualquier virus adecuado conocido en la técnica que es capaz de infectar y lisar células diana.

En la presente memoria descriptiva, se define adenovirus competentes en replicación porque el virus comprende, como parte de su genoma, la función de replicación en la célula diana, en la que la replicación sólo depende de las funciones de replicación proporcionadas por el virus, en combinación con la maquinaria celular endógena de las células diana. Por lo tanto, el genoma de las células diana está libre de cualquiera de los factores que codifican secuencias exógenas que son necesarios para la replicación viral. Estos factores están proporcionados por el genoma del virus competente en replicación.

A este respecto, el término "exógeno" se refiere a que la maquinaria celular (que incluye las secuencias codificantes para la misma), necesaria para la replicación del virus, es el mecanismo presente de forma natural, por ejemplo, que no se ha introducido en las células mediante técnicas de manipulación humanas. Estas últimas se definen como "exógenas". El término "función de replicación" incluye los factores tales como proteínas, codificados por el virus, necesarios para la replicación del virus en las células diana (en adelante referidas además como factores de replicación viral). Dichos factores pueden ser endógenos para dicho virus, pero también pueden ser análogos funcionales codificados por el genoma viral, por ejemplo, en casos en los que el gen que codifica el factor viral endógeno se elimina del genoma viral. Es importante señalar que estos factores son codificados por el genoma viral y no deben ser complementados por factores exógenos codificados en las células diana. Por lo tanto, los virus cuya replicación depende de una o varias funciones de replicación que se han eliminado del virus, pero que se han introducido en la célula diana, se definen como deficientes de replicación y, por lo tanto, no son parte de la presente invención. La presente invención tal como se reivindica se refiere a virus competentes en replicación, es decir, en los que los genes virales que codifican factores de replicación viral, esenciales para la regulación de la replicación del virus en las células diana están presentes en el genoma viral.

En un primer tipo de adenovirus competente en replicación no se han eliminado partes del genoma del adenovirus o dichas partes del genoma del adenovirus que se han eliminado no incluyen las partes que son esenciales para, como mínimo, una etapa del ciclo de vida infeccioso del adenovirus. Por lo tanto, este tipo de adenovirus

recombinante se define además como un adenovirus competente en replicación genuina que tiene una capacidad para replicarse en células como lo hace el adenovirus parental no modificado. En general, la replicación de los adenovirus se limita a las células de una especie animal particular o grupo particular de especies animales. Por ejemplo, los adenovirus recombinantes derivados de adenovirus humanos sólo pueden transversar un ciclo completo de vida en células humanas, con replicación muy ineficaz que tiene lugar a dosis altas en células de otras especies.

Un segundo tipo de adenovirus competente en replicación es el denominado adenovirus de replicación condicional (CRAd, de "Conditional Replicating Adenovirus"). En los CRAd se han eliminado una o más partes del genoma del adenovirus, incluyendo partes que son esenciales, como mínimo, para una etapa del ciclo de vida infeccioso del adenovirus en ciertas condiciones fisiológicas (en la presente memoria descriptiva, en adelante también "primeras condiciones"), pero no en ciertas otras condiciones fisiológicas (en la presente memoria descriptiva, en adelante también "segundas condiciones"). Dichas primeras y segundas condiciones podrían, por ejemplo, estar dictadas por las condiciones fisiológicas que existen en un tipo particular de células (en la presente memoria descriptiva, en adelante también "primeras células"), pero no en otro tipo de células (en la presente memoria descriptiva, en adelante también "segundas células"). Un primer tipo de células es, por ejemplo, una célula obtenida a partir de un tipo particular de tejido, en el que dicha célula contiene una proteína que no está presente en células de otros tejidos, o lo está en una cantidad mucho menor (segundo tipo de células). Un ejemplo de un segundo tipo de células es una célula que ha perdido el control adecuado del crecimiento celular, tal como por ejemplo una célula cancerosa, en la que dicha célula o bien carece de una proteína que está presente en las células que no han perdido el control adecuado del crecimiento celular, o bien en la que dicha célula ha ganado la expresión (o sobreexpresión) de una proteína que no está presente en las células que no han perdido el control adecuado del crecimiento celular o está presente en una cantidad mucho menor. Otro ejemplo de dichas segundas condiciones son las condiciones que existen en una determinada fase del ciclo celular o en una etapa particular del desarrollo de la célula, en la que se expresa específicamente una proteína particular. De este modo, los CRAd pueden diseñarse de tal forma, que la replicación de los mismos se activa en células específicas, tales como las células cancerosas o un tipo particular de células cancerosas, mientras que en las células normales, la replicación de los CRAd no es posible. Esto se conoce en la técnica, y se revisa por ejemplo por Heise y Kirn, J. Clin. Invest. 105 (2000): 847-851; Alemany y otros, Nat. Biotech. 18 (2000): 723-727; Gómez-Navarro y Curiel, Lancet Oncol. 1 (2000): 148-158).

En un tercer tipo de adenovirus competente en replicación, se eliminan partes del genoma que incluyen la función de replicación en la célula diana, pero dicha función se complementa con la inserción de uno o varios casetes funcionales de expresión de proteínas heterólogas que proporcionan dicha función en el genoma del adenovirus recombinante. En la presente memoria descriptiva, se hace referencia a este tipo de adenovirus recombinante como un adenovirus transcomplementado heterológamente y, por lo tanto, debe ser considerado como competente en replicación según la definición que se ha presentado en la presente memoria descriptiva.

El proceso de replicación del adenovirus comprende las siguientes etapas: (1) la infección de la célula huésped mediante la unión de la partícula de adenovirus a la superficie celular, la internalización y el transporte hacia el núcleo de la célula, y la importación de ADN del genoma de adenovirus en el núcleo de la célula, (2) la expresión de las proteínas del adenovirus codificadas por las regiones tempranas del genoma del adenovirus, (3) la replicación del genoma del adenovirus, que marca la transición de la fase de replicación temprana a la fase de replicación tardía, (4) la expresión de las proteínas del adenovirus codificadas por las regiones tardías del genoma del adenovirus, (5) el ensamblaje de las partículas de la progenie de adenovirus y la inclusión de los genomas de la progenie de adenovirus en estas partículas, y (6) la inducción de la muerte celular, lo que conduce a la liberación de la progenie de adenovirus de las células. Durante su ciclo de vida, los adenovirus modulan las rutas de muerte celular. En diferentes líneas celulares, se ha documentado la apoptosis dependiente de p53, así como la independiente de p53 después de la infección por adenovirus (Teodoro y Branton, J. Virol 71 (1997):1739-1746; y referencias contenidas en el mismo). Durante la fase de replicación temprana, se suprime la muerte celular para evitar la muerte prematura de células, permitiendo de este modo que el adenovirus complete su ciclo de vida en la célula. Por el contrario, en las etapas finales de la infección se promueve la muerte celular y la lisis para liberar la progenie de virus desde la célula.

La producción de adenovirus recombinantes comienza habitualmente con la ingeniería genética, como mínimo, de una parte del genoma del adenovirus mediante técnicas estándar de biología molecular conocidas en la técnica. A continuación, el genoma del adenovirus, compuesto por una o más (en este caso superpuestas) construcciones, se introduce en las células que permiten la replicación de dicho adenovirus recombinante mediante métodos de transferencia de ADN conocidos en la técnica. Después de que el adenovirus recombinante ha comenzado a replicarse en las células en las que se ha introducido el genoma del adenovirus recombinante, dicho adenovirus recombinante puede extenderse a otras células en el cultivo. Además, el adenovirus recombinante se puede aislar del medio de cultivo o a partir de lisados de las células en las que dicho adenovirus recombinante se está replicando. El adenovirus recombinante aislado se puede utilizar para volver a infectar nuevas células para propagar y extender aún más dicho adenovirus recombinante. Además, dicho adenovirus recombinante se puede administrar a un animal o un cuerpo humano para infectar a las células *in vivo*. Esta administración se puede hacer a través de varias rutas, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, inyección directa en un tejido, administración oral, inyección en la circulación de la sangre, inhalación, inyección en una cavidad del cuerpo, y aplicación a la superficie de una zona determinada del cuerpo. Después de la infección de dichas células *in vivo*, el adenovirus recombinante puede

replicarse y extenderse a otras células *in vivo*, siempre que las células infectadas soporten la replicación de dicho adenovirus recombinante.

Los adenovirus competentes en replicación se replicarán en muchas células diferentes en un cuerpo animal, siempre que se obtengan a partir de adenovirus con el tropismo correcto de la especie, y que dichas células expresen receptores de superficie para dichos adenovirus. El reconocimiento específico de la superficie celular por adenovirus recombinantes entre los que se incluyen adenovirus competentes en la replicación puede cambiarse por pseudotipado "pseudotyping" o dirección hacia dianas "targeting" (Krasnykh y otros, *Mol. Ther.* 1 (2000): 391-405; Havenga y otros, *J. Virol.* 76 (2002): 4612-4620; Van Beusechem y otros, *Gene Ther.* 10 (2003): 1982-1991). Los CRAd sólo se replicarán en las células en las que las condiciones particulares que existen son las necesarias para la replicación del CRAd. Los CRAd están diseñados para satisfacer los requisitos específicos para la replicación en un tipo de célula elegido (primer tipo) y no en otros tipos de células (segundo tipo). Esta propiedad hace a los CRAd particularmente útiles para varias realizaciones de la presente invención, en la que la intención es tratar una enfermedad mediante replicación lítica específica del adenovirus recombinante de la presente invención en células enfermas en un animal o un cuerpo humano dando como resultado la eliminación específica de dichas células enfermas de dicho organismo.

Los virus competentes en replicación, en particular los adenovirus, están encontrando cada vez mayor utilidad para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que implican una supervivencia celular inadecuada. En particular, se han desarrollado CRAd para replicarse selectivamente en células cancerosas y eliminarlas. Estos CRAd específicos del cáncer representan una nueva y muy prometedora clase de agentes anticancerígenos (revisado por Heise y Kirn, *supra*, Alemany y otros, *supra*; Gómez-Navarro y Curiel, *supra*). La replicación selectiva de tumor de este tipo de CRAd se logra a través de dos estrategias alternativas. En la primera estrategia, la expresión de un gen esencial temprano de adenovirus se controla por un promotor específico de tumor (por ejemplo, Rodríguez y otros, *Cancer Res.* 57 (1997): 2559-2563; Hallenbeck y otros, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999): 1721-1733; Tsukuda y otros, *Cancer Res.* 62 (2002): 3438-3497, Huang y otros, *Gene Ther.* 10 (2003): 1241-1247; Cuevas y otros, *Cancer Res.* 63 (2003): 6877-6884). La segunda estrategia comprende la introducción de mutaciones en los genes virales para anular la interacción del ARN codificado o los productos proteicos con las proteínas celulares, necesarios para completar el ciclo vital del virus en las células normales, pero no en las células tumorales (por ejemplo, Bischoff y otros *Science* 274 (1996): 373-376; Fueyo y otros, *Oncogene* 19 (2000): 2-12; Heise y otros, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000): 4908-4914, Shen y otros, *J. Virol.* 75 (2001):4297-4307; Cascallo y otros, *Cancer Res.* 63 (2003): 5544-5550). Durante su replicación en las células tumorales, los CRAd destruyen las células cancerosas induciendo la lisis, un proceso que es más conocido como "oncolisis". La liberación de la progenie viral de las células cancerosas lisadas ofrece la posibilidad de amplificar CRAd *in situ* y lograr la extensión lateral a las células vecinas en un tumor sólido, ampliando de este modo el efecto oncolítico. La restricción de la replicación del CRAd a las células cancerosas o hiperproliferativas dicta la seguridad del agente, mediante la prevención de la lisis de células del tejido normal. En la actualidad, ya se están evaluando tratamientos anticancerígenos basados en CRAd en ensayos clínicos (por ejemplo, Nemunaitis y otros, *Cancer Res.* 60 (2000): 6359-6366; Khuri y otros, *Nature Med.* 6 (2000): 879-885; Habib y otros, *Hum. Gene Ther.* 12 (2001): 219-226).

Sin embargo, a pesar de los resultados muy alentadores de los estudios *in vitro* y en animales, la eficacia anticancerígena de los CRAd como agente único en seres humanos ha sido limitada (Kirn y otros, *Nature Med.* 4 (1998): 1391-1342; Ganly y otros, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000): 798-806; Nemunaitis y otros, *Cancer Res.* 60 (2000): 6359-6366; Mulvihill y otros, *Gene Therapy* 8 (2001): 308-315). De este modo, existe una clara necesidad en el sector del tratamiento del cáncer de aumentar la potencia de los adenovirus competentes en replicación como agentes oncolíticos. Esto podría lograrse mediante la mejora de sus capacidades de replicación y lisis.

Se han tomado varias estrategias destinadas a mejorar las capacidades de replicación y lisis de los adenovirus competentes en replicación, o a evitar la pérdida de estas funciones del adenovirus de tipo salvaje. Se ha demostrado que es mejor conservar la región E3 del adenovirus en un adenovirus competente en replicación (Yu y otros, *Cancer Res.* 60 (2000): 4200-4203) o, en caso de que se elimine la mayor parte de la región E3 mantener, como mínimo, el gen que codifica la proteína E3 de 11,6 kDa (Tollefson y otros, *J. Virol.* 70 (1996): 2296-2306; Doronin y otros, *J. Virol.* 74 (2000): 6147-6155). Además, se han mejorado la replicación y la lisis celular de adenovirus competentes en replicación mediante la incorporación de genes citotóxicos (Zhang y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 9513-9518; Freytag y otros, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998): 1323-1333; Wildner y otros, *Gene Ther.* 6 (1999): 57-62). Además se ha demostrado que los adenovirus competentes en replicación son más potentes para matar células cancerosas cuando se les ha eliminado el gen que codifica la proteína antiapoptótica E1B de 19 kDa (Martín Duque y otros, *Cancer Gene Ther.* 6 (1999): 554-563; Sauthoff y otros, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000): 379-388). Recientemente, los presentes inventores hemos encontrado que la oncolisis y la liberación de la progenie de adenovirus de las células cancerosas infectadas se puede acelerar mediante la restauración de las funciones de p53 en dichas células cancerosas (van Beusechem y otros, *Cancer Res.* 62 (2002): 6165-6171, documento WO 03/057892). Dicha restauración de las funciones de la p53 se realiza mediante la expresión de un factor de restauración en dichas células cancerosas, es decir, un factor funcional de la ruta de apoptosis dependiente de p53, la función del cual no está expresada o lo está insuficientemente en dichas células cancerosas, en el que dicho factor de restauración comprende preferentemente una proteína (documento WO 03/057892). Por lo tanto, dicho factor de restauración es un componente positivo esencial de la ruta de apoptosis dependiente de p53.

Las células y las líneas celulares cancerosas son el resultado de la transformación neoplásica. Entre los eventos genéticos que subyacen a la transformación neoplásica se incluyen la activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales. A este respecto, un actor importante es el gen que codifica la proteína p53 supresora tumoral. La proteína p53 es el coordinador central de los daños inducidos por el punto de control del ciclo celular. En una célula perturbada, la p53 puede inducir la detención del crecimiento y la muerte celular. La p53 ejerce estos efectos al funcionar como un factor de transcripción específico que controla la expresión de un gran grupo de genes implicados en el control del crecimiento, reparación del ADN, detención del ciclo celular, promoción de la apoptosis, regulación redox, producción de óxido nítrico, y degradación de las proteínas (Polyak y otros, *Nature* 389 (1997): 237-238. El-Deiry, *Sem. Cancer. Biol.* 8 (1998): 345-357; Yu y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999): 14517-14522, Hupp y otros, *Biochem. J.* 352 (2000): 1-17, y referencias en la misma). La inducción de muerte celular por p53 está mediada, como mínimo, en parte por la activación de genes de muerte proapoptótica de la familia bcl-2, tales como *bax*, *bak*, *bad*, *bid*, *bik*, *bim*, *bok*, *blk*, *hrk*, *puma*, *nox* y *bcl-x_s* (Miyashita y Reed, *Cell* 80 (1995): 293-299; Han y otros, *Genes Dev.* 10 (1996): 461-477; Zoernig y otros, *Biochim. Biophys. Acta* 1551 (2001): F1-F37). Por otro lado, los miembros antiapoptóticos de la familia bcl-2, tales como el *bcl-2* mismo y *bcl-x_L*, *bcl-w*, *bf1-1*, *brag-1* y *mcl-1* inhiben la muerte celular dependiente de p53 (Zoernig y otros, *supra*). La proteína antiapoptótica Inhibidor Bax-1 (BI-1) suprime la apoptosis a través de la interacción con *bcl-2* y *bcl-x_L* (Xu y Reed, *Mol. Cell* 1 (1998): 337-346). Las proteínas efectoras inmediatas de p53 y la misma p53 tienen como diana las mitocondrias, liberando de este modo citocromo c en el citosol para activar la cascada de caspasas a través del iniciador caspasa-9/complejo Apaf-1 (Juergensmeier y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998): 4997-5002; Fearnhead y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998): 13664-13669; Soengas y otros, *Science* 284 (1999): 156-159; Marchenko y otros, *J. Biol. Chem.* 275 (2000): 16202-16212). Entre los reguladores negativos de la cascada de caspasas se incluyen sin que constituyan limitación los miembros de la familia de proteínas de la Proteína Inhibidora de Apoptosis (IAP), tales como cIAP1, cIAP2, cIAP3, XIAP y survivina (Zoernig y otros, *supra*).

La pérdida de la función normal de p53 se asocia con la resistencia a la muerte celular programada, la transformación celular *in vitro* y el desarrollo de tumores *in vivo*. En aproximadamente el 50% de los cánceres humanos el gen que codifica la p53 no es funcional mediante la delección o mutación (Levine y otros, *Nature* 351 (1991): 453-456; Hollstein y otros, *Science* 253 (1991): 49-53; Chang y otros, *J. Clin. Oncol.* 13 (1995): 1009-1022). En gran parte del otro 50% de las células cancerosas que sí expresan la proteína p53 de tipo salvaje, la función de p53 se ve obstaculizada por la acción de un "antagonista de p53". En la presente memoria descriptiva, un "antagonista de p53" se define como una molécula capaz de inhibir la función de p53. Por ejemplo, la pérdida de la proteína supresora tumoral p14ARF o la sobreexpresión de la proteína MDM2 puede conducir a la inactivación funcional de p53 mediante la unión a la proteína MDM2 y la posterior degradación (Landers y otros, *Oncogene* 9 (1994): 2745-2750; Florenes y otros, *J. Natl. Cancer Inst.* 86 (1994): 1297-1302; Blaydes y otros, *Oncogene* 14 (1997): 1859-1868; Stott y otros, *EMBO J.* 17 (1998): 5001-5014, Schmitt y otros, *Genes Dev.* 19 (1999): 2670-2677). Entre otros ejemplos que no constituyen limitación de moléculas que promueven la degradación de p53 se incluyen Pirh2 (Leng y otros, *Cell* 112 (2003): 779-791), COP1 (Dornan y otros, *Nature* 429 (2009): 86-92) y Bruce (Ren y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005): 565-570). Otro ejemplo es la inactivación funcional de p53 como resultado de la unión antagonista de la proteína E6 del virus del papiloma humano (VPH) en los carcinomas de cuello uterino (Scheffner y otros, *Cell* 63 (1990): 1129-1136) o del antígeno nuclear (LANA) asociado a la latencia del virus del herpes-8 en el sarcoma de Kaposi (Friborg y otros, *Nature* 902 (1999): 889-894). Aún otro ejemplo es la inactivación funcional de p53 como resultado de la retención citoplasmática a través de la unión de p53 a la Parc (Nikolaev y otros, *Cell* 112 (2003): 29-40) o a la mot-2/mthsp70/GRP75/mortalina (Wadhwa y otros, *Exp. Cell. Res.* 274 (2002): 246-253). Además, algunas moléculas pueden reducir indirectamente la cantidad de p53 funcional en una célula y, por lo tanto, en la presente memoria descriptiva se les considera también como antagonistas de p53, aunque no se les considera miembros de la ruta de p53. Por ejemplo, la expresión elevada de la quinasa-1 tipo polo (plk-1) reduce la estabilidad de la p53 (Liu y Erikson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003): 5789-5794). Además, incluso si la función de la p53 en sí está intacta, la muerte celular dependiente de p53 puede verse obstaculizada debido a la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas que actúan en la ruta de p53 corriente abajo de p53, tales como la bcl-2 antiapoptótica y los miembros de la familia IAP y BI-1. Otro ejemplo es p73DeltaN, que se une a los promotores de respuesta de la p53 compitiendo con la p53, actuando de este modo como antagonista de la muerte celular dependiente de p53 (Kartasheva et al, *Oncogene* 21 (2002): 4715-9727). A los efectos de la presente invención, se hace referencia a dichas proteínas antiapoptóticas que actúan sobre la ruta de p53 aguas abajo de p53 como "inhibidores de la ruta p53". De este modo, en la mayoría de los cánceres *in vivo* y líneas celulares derivadas de cáncer o inmortalizadas *in vitro*, si no en todos, la muerte celular dependiente de p53 se ve obstaculizada como consecuencia de una o más lesiones en la ruta de p53.

Se ha documentado además la pérdida de la función de p53 en otras enfermedades con supervivencia celular inadecuada, tales como por ejemplo la artritis reumatoide (Firestein y otros, *J. Clin. Invest.* 96 (1995): 1631-1638; Firestein y otros, *Am. J. Pathol.* 199 (1996): 2143-2151; Firestein y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (1997): 10895-10900) y la hiperplasia vascular de células musculares lisas (Speir y otros, *Science* 265 (1994): 391-394; Kovacs y otros, *Am. J. Pathol.* 149 (1996): 1531-1539).

Entre otras moléculas implicadas en la regulación de muerte celular programada se incluyen, sin que constituyan limitación, los miembros de la familia de proteínas con dominio efector de muerte (revisado por Tibbetts y otros, *Nat.*

Immunol. 4 (2003): 404-909). Debe entenderse que muchas proteínas antiapoptóticas conocidas como importantes en la regulación de la muerte celular programada o el mantenimiento de las células cancerosas no actúan en la ruta de la p53. Por lo tanto, no se las considera miembros de la ruta de la p53. Por ejemplo, la inhibición de la ciclina E o de las proteínas de iniciación de la replicación del ADN, o de la sintasa de ácidos grasos o de la PAX2 provoca apoptosis en células cancerosas (Li y otros, Cancer Res. 63 (2003): 3593-3597; Feng y otros, Cancer Res. 63(2003): 7356-7364; De Schrijver y otros, Cancer Res. 63 (2003): 3799-3804; Muratovska y otros, Oncogene 22(2003): 6095-6053). Por lo tanto, todos estos objetivos cuya inhibición conducen a la apoptosis y que son miembros de la ruta de p53 se consideran, a los efectos de la presente invención, proteínas antiapoptóticas. Muchos de los genes conocidos por ser importantes en la regulación de la muerte celular programada o el mantenimiento de las células cancerosas se han mostrado como dianas para terapias anticancerígenas (revisado por Jansen y Zangemeister-Wittke, Lancet Oncol. 3 (2002): 672-683). Varios métodos se han utilizado con éxito para suprimir estas dianas de forma selectiva, entre los que se incluyen la expresión de proteínas dominantes negativas, la introducción de moléculas inhibitoras pequeñas, la expresión de ARN antisentido y la interferencia de ARN. La presente invención utiliza la interferencia de ARN.

La interferencia de ARN (ARNi) es un sistema de vigilancia celular conservado que reconoce ARN de doble cadena (ARNdc) y activa una secuencia específica de degradación de especies de ARN homólogo al ARNdc (Hannon, Nature 418 (2002): 244-251). Además, el ARNi puede provocar silenciamiento génico transcripcional mediante metilación de un promotor de ADN dirigido a ARN y/o metilación de histona (Kawasaki y Taira, Nature 431 (2009): 211-217; Morris y otros, Science 305 (2004): 1289-1292). Además, en algunas especies el ARNi ha estado implicado en la eliminación programada de ADN y silenciamiento meiótico (revisado por Matzke y Birchler; Nature Rev. Genet. 6 (2005): 24-35). La observación de que el ARNdc podría provocar un efecto de silenciamiento génico potente y específico se hizo por primera vez en experimentos con *Caenorhabditis elegans*, en la que ARNdc, un subproducto de la generación de ARN antisentido, demostró ser más eficaz que el propio ARN antisentido (Fire y otros Nature 391 (1998): 806-811). En retrospectiva, esta observación ofreció una explicación al fenómeno de silenciamiento génico post-transcripcional encontrado con frecuencia en plantas transgénicas (Baulcombe, Plant Mol. Biol. 32 (1996): 79-88). Después de estos informes iniciales, se han descrito procesos relacionados con ARNi en casi todos los organismos eucariotas, tales como protozoos, moscas, nemátodos, insectos, parásitos, y líneas celulares humanas y de ratón (revisado en: Zamore, Nat. Struct. Biol. 8 (2001): 746-750; Hannon, Nature 418 (2002): 294-251; Agrawal y otros, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67 (2003): 657-685). Por ahora, la interferencia de ARN es el método más ampliamente utilizado para regular a la baja específicamente genes para estudios funcionales.

El mecanismo molecular de ARNi implica el reconocimiento y la división de ARNdc en ARN pequeños de interferencia (ARNpi) por los enzimas ARNasa III Dicer y Drosha (Carmell y Hannon, Nat. Struct. Biol. 11 (2009): 214-218), la incorporación de los ARNpi en un complejo multiproteico llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) y la degradación del ARN homólogo (Caudy y otros, Nature 425 (2003): 911-914). Los ARNpi desempeñan un papel fundamental en la guía del RISC hacia el ARNm diana. Los ARNpi comprenden dúplex de ARN de 21-23 nucleótidos de doble cadena que portan 2 salientes de nucleótidos 3'-OH que determinan en parte la eficacia del silenciamiento génico (Elbashir y otros Genes Dev. 15 (2001): 188-200). Durante la incorporación del ARNpi al complejo RISC, el ARNpi se desenrolla y sólo una cadena se ensambla en el complejo RISC activo. Este proceso es de naturaleza asimétrica y preferentemente el RISC acepta la cadena de ARNpi que presenta el extremo 5' menos estable (Khvorova y otros, Cell 115 (2003): 209-216; Schwarz y otros Cell 115 (2003): 199-208). Esto tiene implicaciones importantes en la selección de las secuencias de ARNpi, porque solamente serán eficaces los ARNpi de los cuales la cadena antisentido se ensambla al RISC (en relación con el ARNm diana). Se han propuesto directrices para la selección de secuencias de ARNpi altamente efectivas basadas en el perfil de energía libre de las secuencias de ARNpi (Khvorova y otros, Cell 115 (2003): 209-216; Schwarz y otros, Cell 115 (2003): 199-208; Reynolds y otros, Nat. Biotechnol. 22 (2004): 326-330; Ui-Tei y otros, Nucleic Acids Res. 32 (2004): 936-948).

La aplicación de ARNdc para silenciar la expresión de genes en células de mamíferos se ha quedado atrás debido a la aparición de una respuesta general desencadenada por las moléculas de ARNdc de más de 30 pares de bases. Esta respuesta está mediada por la proteína quinasa (PKR) activada por ARNdc y la 2', 5'- OligoA-sintetasa/ARNseL y da como resultado un cese de la traducción seguido por apoptosis (Kumar y Carmichael, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1998): 1415-1934; Gil y Esteban, Apoptosis 5 (2000): 107-114). Por lo tanto, inicialmente, la aplicación de ARNi por ARNdc largo se limitó a células de mamíferos que carecen de la respuesta de PKR: es decir, las células embrionarias (Billy y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001): 14428-14433, Svoboda y otros, Development 127 (2000): 4197-9156). En un experimento muy importante, Elbashir y colaboradores mostraron que ARNpi sintetizados químicamente, que se asemejan a los ARNpi producidos por Dicer y Drosha, indujeron silenciamiento génico específico en células de mamífero cultivadas sin provocar la respuesta de PKR (Elbashir y otros, Nature 411 (2001): 188-200). Los ARNpi sintetizados son ampliamente utilizados ahora como herramienta para estudiar la función de genes individuales ofreciendo un método conveniente y rápido para silenciar genes (McManus y Sharp, Nat. Rev. Genet. 3 (2002): 737-747). Sin embargo, la naturaleza transitoria del efecto silenciador y la dificultad de administración de ARNpi sintéticos *in vivo* limitan la utilidad de esta estrategia.

Un medio más para generar ARNpi es expresar pequeñas moléculas de ARN dentro de la célula, bien sea por la coexpresión de los ARN sentido y antisentido (Zheng y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 201 (2004): 135-140; Miyagishi y otros, Nat. Biotechnol. 20 (2002): 497-500; Lee y otros, Nat. Biotechnol. 20 (2002): 500-505), o bien como una

transcripción única que forma una estructura de tallo-bucle "stem-loop". Estas últimas moléculas de ARN se denominan generalmente como ARN de horquilla corta (ARNhc) y comprenden habitualmente un tallo de 19-29 nucleótidos que contiene las cadenas sentido y antisentido complementarias y un bucle de tamaño variable. Los ARNhc generados en el interior de la célula son procesados por Dicer para formar ARNpi y son capaces de inducir ARNi. Se han utilizado una gran variedad de promotores para conducir la expresión de ARNhc. Los promotores de ARN polimerasa III son especialmente apropiados porque tienen sitios de iniciación bien definidos y un sitio de terminación que comprende un tramo, como mínimo, de 4 nucleótidos de timidina consecutivos. Los promotores de ARN polimerasa III (polIII) H1, U6 y ARNt (Val) se han utilizado con éxito para expresar ARNhc (Brummelkamp y otros, Science 296 (2002): 550-553; Paddison y otros, Genes Dev. 16 (2002) 948-958; Kawasaki y Taira, Nucleic Acids Res. 31 (2003): 700-707). Recientemente, se han desarrollado casetes de expresión de ARNhc basados en polIII inducibles por fármacos para permitir la supresión condicional de genes en células de mamíferos (Wiznerowicz y Trono, J. Virol. 77 (2003): 8957-8961; Gupta y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004): 1927-1932). Los promotores de ARN polimerasa II (polII) son menos adecuados para expresar ARNhc funcionales y los primeros intentos no fueron capaces de inducir silenciamiento (Paddison y otros, Genes Dev. 16 (2002) 948-958). Sin embargo, se reportó la utilización satisfactoria del promotor CMV de polII mediante la utilización de un mínimo de promotor CMV y una señal modificada de poliA (Xia y otros, Nat. Biotechnol. 20 (2002): 1006-1010) o mediante la escisión de la transcripción mediada por ribozima (Kato y Taira, Oligonucleotides 13 (2003): 335-343; Shinagawa e Ishii, Genes Dev. 17 (2003): 1340-1345).

Los informes de que los ARNhc expresados a partir de plásmidos podrían desencadenar ARNi permitieron la utilización de vectores virales. La administración de retrovirales o lentivirales en células de mamíferos conduce a la integración estable del casete de expresión del ARNhc en el genoma y a la supresión del gen sostenida a largo plazo, y se utiliza con frecuencia (por ejemplo, (Brummelkamp y otros, Science 296 (2002): 550-553; An y otros, Hum. Gene Ther. 14 (2003): 1207-1212). Los vectores adenovirales infectan a las células en división y que no están en división, pero permanecen episomales. Se ha demostrado que los vectores adenovirales no replicativos que expresan ARNhc inducen el silenciamiento de genes diana *in vitro* e *in vivo* (Xia y otros, Nat. Biotechnol. 20 (2002): 0006-1010, Arts y otros, Genome Res. 13 (2003): 2325-2332; Shen y otros, FEBS Lett. 539 (2003): 111-114, Zhao y otros, Gene 316 (2003): 137-141; documento WO 2004/013355). Hasta ahora, sólo se ha producido ARNi con vectores virales utilizando vectores virales deficientes en replicación. Como aclaración, se repite en este punto de la descripción que la presente invención se refiere sólo a virus competentes en replicación. No se ha sugerido con anterioridad utilizar ARNi en el contexto de virus competentes en replicación porque no es obvio. Se ha reconocido el ARNi como un mecanismo de defensa celular contra la infección viral y esto ha conducido a muchos virus a desarrollar moléculas que inhiben el ARNi (Cullen, Nature Immunol. 3 (2002): 597-599; Roth y otros, Virus Res. 102(2004):97-108). Por lo tanto, anteriormente a la presente invención había razones para asumir que el proceso de ARNi estaría impedido en células en las que un virus se está replicando. Los resultados dados a conocer en la presente memoria descriptiva, que no pudieron predecirse de la bibliografía anterior, demuestran que el ARNi se puede utilizar de forma satisfactoria en el contexto de un virus competente en replicación.

En la actualidad, la interferencia de ARN en células de mamíferos se utiliza ampliamente para analizar la función de genes individuales. Numerosos genes se han silenciado con éxito en células de mamíferos, ya sea por la transfección de ARNpi de síntesis química o por la expresión de ARNhc. Entre las clases de genes diana se incluyen los genes implicados en la transducción de señales, regulación del ciclo celular, desarrollo, muerte celular, etc. (Milhavet y otros, Pharmacol. Rev. 55 (2003): 629-648). Los estudios sistemáticos para delinear la función de genes a escala del genoma son factibles cuando las grandes librerías dirigidas a los genes humanos están disponibles. Grandes librerías de ARNpi sintetizados químicamente ya están disponibles en el mercado (de Dharmacon y Qiagen), la cuales causan la inhibición fuerte pero transitoria de la expresión génica. Por el contrario, los ARNpi expresados por vectores pueden suprimir la expresión de genes durante periodos prolongados. Dos grupos de investigación (Berns y otros, Nature 428 (2004): 431-437; Paddison y otros, Nature 428 (2004): 427-431) de forma independiente construyeron una biblioteca basada en ARNhc que cubre 7.914 y 9.610 genes humanos, respectivamente, e informaron acerca de la misma. Ambas librerías utilizan los promotores de polIII y un vector retroviral basado en virus de células madre murinas autoinactivante. Estas librerías ayudarán a identificar la función de los genes en células de mamíferos utilizando cribados genéticos de alto rendimiento. Berns y otros (*supra*) ya utilizaron su librería para identificar nuevos componentes de la ruta de p53 mediante el cribado de la inhibición de la senescencia celular. Se espera que se lleven a cabo cribados genéticos de alto rendimiento sintéticos letales para evaluar la capacidad de ARNhc para matar células tumorigénicas construidas pero no sus células homólogas isogénicas normales (Brummelkamp y Benards, Nat. Rev. Cancer 3 (2003): 781-789). De este modo, se prevé la identificación de ARNhc anticancerígenos selectivos.

Descripción breve de la invención.

En muchos casos es preferente que un adenovirus competente en replicación experimente un ciclo de vida rápido en una célula huésped. Cuando se produce un adenovirus competente en replicación o cuando un adenovirus competente en replicación se utiliza como vector para producir una proteína en las células, un ciclo de vida rápido del adenovirus acelera el proceso de producción. Cuando un adenovirus competente en replicación se utiliza como medio para matar a una población de células, un ciclo de vida rápido aportará eficacia al proceso. Un ciclo de vida rápido es de particular importancia para la utilización de un adenovirus competente en replicación *in vivo*. Los

adenovirus inducen respuestas inmunes potentes en el cuerpo de los animales que inactivan dicho adenovirus. Esto limita la duración de la replicación *in vivo* de un adenovirus competente en replicación administrado. De este modo, un ciclo de vida más rápido permitirá más ciclos de producción de progenie de virus en el lapso de tiempo entre la administración y la inactivación de los adenovirus competentes en replicación. Una situación en la que un ciclo de vida rápido de un adenovirus competente en replicación es de particular importancia *in vivo* es en el contexto del tratamiento de una enfermedad que implica la supervivencia celular inadecuada. Un ejemplo paradigmático de esta enfermedad es el cáncer. La potencia anticancerígena de un adenovirus competente en replicación, que se administra a un tumor *in vivo* depende de (1) la eficacia con la que el virus se disemina por todo el tumor produciendo progenie que puede infectar a las células tumorales vecinas, y (2) la eficacia con la que el virus destruye las células tumorales a través de la replicación y la lisis de dichas células. De este modo, un ciclo de vida rápido se traducirá en una oncolisis más rápida, más ciclos de producción de nuevos virus por unidad de tiempo, infección de más células tumorales por unidad de tiempo y, en consecuencia, una destrucción más eficaz de tumores.

Por lo tanto, un primer diana de la presente invención es da a conocer adenovirus competentes en replicación, que tienen un tiempo de replicación corto en una célula huésped. Dicho tiempo de replicación se entiende como el tiempo entre la entrada del adenovirus competente en replicación en la célula y la liberación de la progenie de dicho adenovirus competente en replicación desde la célula.

Un segundo objetivo de la presente invención es dar a conocer adenovirus competentes en replicación que tienen una capacidad lítica rápida. Una capacidad lítica rápida se entiende como un tiempo corto requerido para la lisis de una célula huésped después de la entrada de los adenovirus competentes en replicación en la dicha célula huésped.

Según la presente invención, dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida del adenovirus competente en replicación están provocados por el silenciamiento de la expresión de uno o más genes diana en la célula huésped a través de interferencia de ARN. De este modo, debe entenderse claramente que la presente invención utiliza la interferencia de ARN para proporcionar dicho adenovirus competente en replicación con dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida.

En las realizaciones preferentes de la presente invención, dicha interferencia de ARN es inducida por uno o más factores de silenciamiento que se expresan a partir del genoma del adenovirus competente en replicación, en los que es preferente además que dichos factores de silenciamiento sean moléculas de ARNhc. En una variación menos preferente de la presente invención, dichos factores de silenciamiento comprenden moléculas de ARN de doble cadena que se forman en la célula a partir de dos moléculas de ARN expresado a partir del genoma del adenovirus competente en replicación.

En realizaciones preferentes adicionales de la presente invención, dicha célula huésped en la que dichos adenovirus competentes en replicación tienen un tiempo de replicación corto y/o una capacidad lítica rápida es una célula que expresa uno o más factores inhibidores de adenovirus. En una realización preferente de la presente invención, dicha célula huésped es una célula con un defecto en una ruta de muerte celular. En otra realización preferente de la presente invención, dicha célula huésped tiene obstaculizada la ruta de muerte celular dependiente de p53. Dicha célula es preferentemente una célula humana. Entre los ejemplos que no constituyen limitación de las células huésped según la presente invención se encuentran las células cancerosas o tumorales, células artríticas y células hiperproliferativas del músculo vascular liso.

Se debe entender que entre los “defectos en una ruta de muerte celular” se incluyen la incapacidad de una célula para responder a una pérdida del punto de control del ciclo celular, al daño del ADN y/o a la expresión de oncogenes mediante la ejecución de la muerte celular programada. Dicho defecto en una ruta de muerte celular provoca “supervivencia celular inapropiada”.

En una variación de la presente invención, dicha célula huésped es una célula que se está cultivando *in vitro*. En otra variación de la presente invención, dicha célula huésped es una célula en un cuerpo animal, en la que es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano.

En una realización preferente de la presente invención, dicha capacidad lítica rápida es el resultado de la restauración de dicho defecto en una ruta de muerte celular. En una realización adicional preferente de la presente invención, dicha restauración se encuentra en la ruta de muerte celular dependiente de p53.

En una variación de la presente invención, el adenovirus competente en replicación según la presente invención que expresa uno o más factores de silenciamiento a partir de su genoma, expresa además un factor funcional de la ruta de apoptosis dependiente de p53 según la presente invención, dado a conocer en el documento WO 03/057892. Esta variación de la presente invención da a conocer de este modo el efecto combinado de la restauración de la ruta de apoptosis dependiente de p53 mediante la expresión de dicho factor funcional y del silenciamiento de uno o más factores de inhibición de adenovirus por dichos uno o más factores de silenciamiento.

- De este modo, los adenovirus competentes en replicación según la presente invención son capaces de replicarse en una célula huésped y expresar uno o más factores de silenciamiento. Dichos factores de silenciamiento silencian la expresión de un factor de la célula huésped capaz de inhibir dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida de los adenovirus competentes en replicación en dicha célula huésped. También se hace referencia a dicho factor de la célula huésped que inhibe dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida del adenovirus competente en replicación como un “factor inhibidor de adenovirus”. El carácter de dicho factor inhibidor de adenovirus no está dictado de ninguna manera más que en expresarse en la célula huésped y ser capaz de inhibir la replicación de adenovirus o la lisis de la célula huésped inducida por adenovirus. Los factores inhibidores de adenovirus de la presente invención son antagonistas de la p53. Otros factores inhibidores de adenovirus se pueden identificar utilizando un método para identificar un factor inhibidor de adenovirus (*infra*). La cantidad de silenciamiento producida por dicho uno o más factores de silenciamiento debería ser suficiente para disminuir la cantidad de factor inhibidor de adenovirus a un nivel que permita dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida del adenovirus competente en replicación de la presente invención en dicha célula.
- En una variación de la presente invención, el adenovirus competente en replicación que expresa uno o más factores de silenciamiento a partir de su genoma, según la presente invención, comprende además una o más modificaciones en su genoma conocidas en la técnica que cambian su tropismo, es decir, la especificidad de reconocimiento de célula diana.
- En otra variación de la presente invención, el adenovirus competente en replicación que expresa uno o más factores de silenciamiento a partir de su genoma, según la presente invención, comprende además una o más modificaciones en su genoma conocidas en la técnica que reducen su inmunogenicidad.
- En aún otra variación de la presente invención, el adenovirus competente en replicación que expresa uno o más factores de silenciamiento a partir de su genoma, según la presente invención, comprende además una o más modificaciones en su genoma conocidas en la técnica que limitan su replicación en un primer tipo de células pero no en un segundo tipo de células.
- En aún otra variación de la presente invención, el adenovirus competente en replicación que expresa uno o más factores de silenciamiento a partir de su genoma, según la presente invención, comprende además una o más modificaciones en su genoma conocidas en la técnica que aumentan su capacidad de replicación y/o lítica.
- Tal como se ha destacado anteriormente, debe entenderse claramente que los términos “competente en replicación” y ser “capaz de replicarse en una célula huésped” significan que dichos adenovirus recombinantes solos son capaces de completar su ciclo de vida infeccioso en dicha célula huésped con la ayuda de la maquinaria endógena de dicha célula huésped, sin la necesidad de proporcionar ninguna función codificada por las partes eliminadas del genoma de dicho adenovirus recombinante por otros medios, tales como la provisión de los mismos en el genoma de la célula huésped. Dicho adenovirus recombinante es un adenovirus competente en replicación, preferentemente un adenovirus de replicación condicional o un adenovirus heterólogo transcomplementado. Dicho adenovirus recombinante no es un adenovirus deficiente en replicación.
- El término “factor de silenciamiento” significa una molécula de ARN capaz de disminuir la expresión de un gen diana a través del proceso de interferencia de ARN. Dicha molécula de ARN comprende preferentemente una parte de cadena doble, preferentemente con una longitud, como mínimo, de 19 nucleótidos (por cadena). La parte de cadena doble tiene preferentemente una longitud de menos de 30 nucleótidos, y dicha molécula de ARN, comprende preferentemente un ARN de horquilla corta, tal como se ha indicado anteriormente (ARN_{hc}), o comprende una estructura de cadena doble que comprende dos moléculas de ARN diferentes con regiones complementarias preferentemente de la longitud anterior. En este último caso, dichas moléculas de ARN pueden transcribirse a partir de diferentes promotores. Preferentemente, dichas moléculas de ARN son susceptibles a la acción (es decir, al reconocimiento y la división de ARN_{dc}) de las enzimas ARNasa III mencionadas anteriormente, lo que da como resultado los ARN_{pi} descritos anteriormente. Se entiende que el término “gen diana” indica que el proceso de disminución de la expresión de dicho gen se produce con especificidad.
- La presente invención da a conocer además formulaciones que comprenden adenovirus competentes en replicación según la presente invención que se puede utilizar para preservar dichos adenovirus competentes en replicación y para administrar dichos adenovirus competentes en replicación a células. En una variación, las formulaciones se utilizan para administrar dichos adenovirus competentes en replicación a células *in vitro*, en otra variación las formulaciones se utilizan para administrar dichos adenovirus competentes en replicación a células *in vivo*.
- La presente invención da a conocer además métodos para administrar las formulaciones según la presente invención a células, lo que conduce a la infección de dichas células con los adenovirus competentes en replicación de la presente invención. En una variación, los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a células *in vitro*, en otra variación los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a células *in vivo*.
- La presente invención da a conocer además composiciones de adenovirus competentes en replicación según la presente invención y las células en las que los adenovirus competentes en replicación según la presente invención

inducen lisis celular acelerada y/o una liberación más rápida de la progenie de virus, en comparación con adenovirus competentes en replicación que no expresan uno o más factores de silenciamiento según la presente invención. En una variación preferente de la presente invención, dichas células son células cancerosas y dicha lisis celular es oncolisis. En otra variación preferente de la presente invención, dichas células son células humanas.

5 En otra realización, la presente invención da a conocer composiciones de adenovirus competentes en replicación según la presente invención y tumores en los que los adenovirus competentes en replicación según la presente invención inducen lisis celular acelerada y/o una liberación más rápida de la progenie de virus, en comparación con los adenovirus competentes en replicación que no expresan uno o más factores de silenciamiento según la presente invención. En este aspecto de la presente invención, es preferente que dichas lisis celular acelerada y/o liberación más rápida de la progenie de virus dé como resultado una propagación lateral acelerada por dichos adenovirus competentes en replicación desde las células infectadas a las células vecinas en dichos tumores, en comparación con adenovirus competentes en replicación que no expresan uno o más factores de silenciamiento según la presente invención, en el que es preferente además que dichas lisis celular acelerada, liberación más rápida de la progenie de virus y/o propagación lateral acelerada conduzca a una destrucción o inhibición del crecimiento de dichos tumores más eficaz. En una variación preferente de la presente invención, dichos tumores están creciendo en un cuerpo animal. En una variación adicional, dicho cuerpo animal es un cuerpo humano.

20 La presente invención da a conocer además métodos para construir los adenovirus competentes en replicación según la presente invención y para producir las formulaciones y composiciones de la presente invención.

25 La presente invención contempla además la utilización de adenovirus competentes en replicación, métodos y formulaciones según la presente invención para el tratamiento de una enfermedad que comprende la supervivencia celular inadecuada, en la que es preferente que dicha enfermedad sea una enfermedad en un ser humano. En una realización particular de la presente invención dicha enfermedad es el cáncer.

30 La presente invención da a conocer además métodos para identificar factores inhibidores de adenovirus que se expresan en las células. En realizaciones preferentes, dichas células son células con un defecto en una ruta de muerte celular y dichas células son células humanas.

La presente invención da a conocer además métodos para identificar y seleccionar factores de silenciamiento que son útiles para ser expresados a partir del genoma de los adenovirus competentes en replicación según la presente invención.

35 En adelante en la presente memoria descriptiva, en varias realizaciones de la presente invención se dan diversas maneras para proporcionar dichos adenovirus competentes en replicación, factores de silenciamiento, formulaciones, métodos, composiciones y utilidades. Debe entenderse claramente que la presente descripción no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la presente invención, tal como se ha explicado anteriormente de manera general. Los técnicos en la materia serán capaces de transferir las enseñanzas de la presente invención a otros adenovirus competentes en replicación, factores de silenciamiento, formulaciones, métodos, composiciones y utilidades que no se han mencionado específicamente en la presente memoria descriptiva sin salirse de la presente invención.

45 Debe entenderse además que la presente invención incluye todas las utilidades combinadas de los adenovirus competentes en replicación, factores de silenciamiento, formulaciones, métodos y composiciones de la presente invención junto con otros métodos y medios para matar a una población de células, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, la irradiación, la introducción de genes que codifican proteínas proapoptóticas, proteínas tóxicas, tal como por ejemplo toxinas o enzimas que se convierten profármaco, y la administración de compuestos químicos, anticuerpos, antagonistas de los receptores, y similares.

50 Se considera que las definiciones de los términos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones de la presente invención están suficientemente bien definidas en la presente memoria descriptiva o de lo contrario que están claramente entendidas en la técnica. Además, cualquier secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos de factores/proteínas descritos en la presente memoria descriptiva es una secuencia conocida, en la que se hace referencia a los bancos de datos de secuencias disponibles comúnmente, tales como los bancos de datos del EMBL, Heidelberg, Alemania, y GENBANK.

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención y las realizaciones preferentes se hacen evidentes a partir de las reivindicaciones adjuntas.

65 En una realización, la presente invención da a conocer un adenovirus competente en replicación capaz de replicarse en una célula huésped, que se caracteriza porque dicho virus, comprende, como mínimo, una secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento, en particular, un ARN de horquilla corta, capaz de reducir la expresión de un factor inhibidor de adenovirus en dicha célula huésped, estando dicha secuencia de ADN funcionalmente ligada a

secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicho factor de silenciamiento se expresa en dicha célula huésped en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación.

5 En una variación de la presente invención, se da a conocer un adenovirus competente en replicación, que comprende más de una secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento capaz de reducir la expresión de un gen diana en dicha célula huésped, vinculada funcionalmente a secuencias de ADN reguladoras de tal de manera que dicho factor de silenciamiento se expresa en una célula en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación. En una variación, como mínimo, dos secuencias de ADN de dichas más de una secuencia de ADN codifican cada un factor de silenciamiento diferente capaz de reducir la expresión de un gen diana diferente. Esta
10 variación de la presente invención se utiliza para silenciar la expresión de más de un gen diana en dichas células huésped. En otra variación, como mínimo, dos secuencias de ADN de dichas más de una secuencia de ADN codifican cada una un factor de silenciamiento diferente capaz de reducir la expresión del mismo gen diana. Esta variación de la presente invención se utiliza para silenciar más eficazmente la expresión de dicho gen diana, en dicha célula huésped.

15 Un adenovirus competente en replicación se describe porque comprende, como mínimo, una secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento capaz de reducir la expresión de un gen diana en dicha célula huésped, estando dicha secuencia de ADN funcionalmente ligada a secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicho factor de silenciamiento se expresa en dicha célula huésped en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación y comprende además, como mínimo, un marco de lectura abierto para un factor de restauración capaz de restablecer la ruta de la apoptosis dependiente de p53 en el dicha célula huésped según el documento WO 03/057892, estando dicho marco de lectura abierto funcionalmente vinculado a secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicho factor de restauración se expresa en dichas células huésped en las que se introduce dicho adenovirus recombinante.

20 Los factores de silenciamiento útiles que se van a expresar a partir del genoma de los adenovirus competentes en replicación de la presente invención en las células huésped en las que dichos adenovirus competentes en replicación se están replicando forman moléculas de ARN de doble cadena que son procesadas por Dicer en dichas células huésped para formar ARNpi que son capaces de inducir ARNi en dichas células huésped.

25 El virus puede replicarse en la célula huésped de varias formas, tal como se ha mencionado anteriormente; el técnico en la materia se dará cuenta de las estrategias de replicación adecuadas útiles para la práctica de la presente invención.

30 El adenovirus recombinante de la presente invención es un adenovirus competente en replicación, tal como (1) un adenovirus competente en replicación genuino (2) un adenovirus de replicación condicional, o (3) un adenovirus transcomplementado de forma heteróloga, o (4) un adenovirus bicomponente competente en replicación, transcomplementado de forma heteróloga, o de replicación condicional que comprende como primer componente un adenovirus recombinante que comprende, como mínimo, una secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento capaz de reducir la expresión de un gen diana en dicha célula huésped, estando dicha secuencia de ADN funcionalmente ligada a secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicho factor de silenciamiento se expresa en dicha célula huésped en la que se introduce dicho adenovirus recombinante y como segundo
35 componente un adenovirus competente en replicación, transcomplementado de forma heteróloga, o de replicación condicional, en el que es preferente un adenovirus monocomponente competente en replicación según las posibilidades 1, 2 ó 3.

40 Ejemplos que no constituyen limitación de adenovirus de replicación condicional según la presente invención se obtienen a partir de adenovirus con la expresión controlada, como mínimo, de un gen de adenovirus temprano esencial por un promotor específico de tumor, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, los descritos por Rodríguez y otros (Cancer Res. 57 (1997): 2559-2563), Hallenbeck y otros (Hum. Gene Ther. 10 (1999): 1721-1733), Tsukuda y otros (Cancer Res. 62 (2002): 3438-3447), Huang y otros (Gene Ther. 10 (2003): 1241-1247) y Cuevas y otros (Cancer Res. 63 (2003): 6877-6884), o adenovirus con mutaciones en los genes virales para impedir la interacción de las proteínas codificadas con las proteínas celulares, necesarias para completar el ciclo vital del virus en las células normales, pero no en las células tumorales, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, los descritos por Heise y otros (Nature Med. 6 (2000): 1134-1139), Balague y otros (J. Virol. 75 (2001): 7602-7611), Howe y otros (Mol. Ther. 2 (2000): 485-994), Fueyo y otros (Oncogene 19 (2000): 2-12), Shen y otros (J. Virol. 75 (2001): 9297-4307) y Cascallo y otros (Cancer Res. 63 (2003): 5549-5550), o los adenovirus que comprende ambos tipos de modificaciones. Un ejemplo no limitante de un adenovirus transcomplementado de forma heteróloga según la presente invención se obtiene a partir de un adenovirus recombinante con una región E1 suprimida funcionalmente que expresa las proteínas E6 y E7 de VPH (Steinwaerder y otros, Mol. Ther. 4 (2001): 211-216).

45 En una realización, el adenovirus competente en replicación según la presente invención se caracteriza porque dicho factor de silenciamiento es capaz de reducir la expresión de un antagonista de p53, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación MDM2, Pirh2, COP1, Bruce, VPH-E6, virus del herpes-8 LANA Parc, mortalina, plk-1 y P73 DeltaN.

En otra realización, el adenovirus competente en replicación según la presente invención se caracteriza porque dicho factor de silenciamiento es capaz de reducir la expresión de un factor inhibidor de adenovirus, en el que dicho factor inhibidor de adenovirus se caracteriza porque retrasa la replicación de un adenovirus competente en replicación que carece de dicho factor de silenciamiento en una célula huésped o porque retrasa la lisis de una célula huésped en la que se está replicando un adenovirus competente en replicación que carece de dicho factor de silenciamiento. Debe entenderse claramente que en esta realización de la presente invención el carácter de dicho factor inhibidor de adenovirus no está dictado de ninguna otra manera que por estar expresado en dicha célula huésped y por ser capaz de inhibir la replicación del adenovirus o la lisis de la célula huésped inducida por adenovirus. Dicho "ser capaz de inhibir la replicación del adenovirus o la lisis de la célula huésped inducida por adenovirus" significa que en la presencia de una cantidad suficiente de dicho factor inhibidor de adenovirus en una célula huésped el 10% de la finalización del proceso de replicación de adenovirus o el 50% del proceso de lisis de la célula huésped inducida por adenovirus se retrasa en el tiempo, como mínimo, en un 10% en comparación con la situación idéntica en la ausencia de dicho factor inhibidor de adenovirus, en el que es preferente que dicho proceso se retrase, como mínimo, en un 20% y en el que es más preferente que dicho proceso se retrase, como mínimo, en un 50%. En una variación de la presente invención, dicho factor inhibidor de adenovirus se identifica mediante un método según la presente invención (*infra*).

Las secuencias de control unidas operativamente a secuencias que codifican el factor de silenciamiento incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Estas secuencias de control se pueden seleccionar para que sean compatibles con la célula huésped para la cual se ha diseñado el vector de expresión que se va a utilizar en la misma. El término promotor es bien conocido en la técnica y abarca regiones de ácido nucleico que varían en tamaño y complejidad, desde promotores mínimos hasta promotores que incluyen elementos corriente arriba y potenciadores. El promotor se selecciona típicamente a partir de promotores que son funcionales en células de mamífero, aunque se pueden utilizar promotores funcionales en otras células eucariotas. El tipo de promotor se selecciona para llevar a cabo un perfil de expresión útil para dicho factor de silenciamiento en el contexto de dicho adenovirus competente en replicación. Tal como se ha descrito *supra*, los promotores de ARN polimerasa III, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, promotores U6, H1 y ARNt (Val) son especialmente adecuados para la presente invención, pero otros promotores no están excluidos.

En una variación de la presente invención, dicha secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento está funcionalmente vinculada a una o más secuencias de control, es decir, secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicho factor de silenciamiento se expresa de forma ubicua en una célula en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación. En otra variación de la presente invención, dicha secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento está vinculada funcionalmente a una o más secuencias de control, es decir, secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicho factor de silenciamiento sólo se expresa o lo hace en un nivel superior en una célula en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación en ciertas condiciones que pueden modularse por una señal externa, en la que el término "externo" significa que tiene su origen fuera del fragmento de ADN que abarca dicha secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento y dichas secuencias de ADN reguladoras. En este aspecto de la presente invención, la expresión de dicho factor de silenciamiento está dirigida por un denominado promotor regulable o inducible. En aún otra variación de la presente invención, dicha secuencia de ADN que codifica dicho factor de silenciamiento está vinculada funcionalmente a secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicho factor de silenciamiento sólo se expresa durante la fase tardía de la replicación del adenovirus en una célula en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación. En este aspecto de la presente invención, es preferente que la expresión de dicho factor de silenciamiento esté dirigido por el promotor principal tardío del adenovirus (MLP), preferentemente el MLP endógeno.

La presente invención no determina el lugar de inserción de dicha secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento vinculado funcionalmente a las secuencias reguladoras de ADN en el genoma de dicho adenovirus competente en replicación; dicha inserción puede ser en cualquier lugar del dicho genoma que no inhiba la replicación de dicho adenovirus competente en replicación en dicha célula en la que se introduce dicho adenovirus competente en replicación y en el que los casetes de expresión endógenos en dicho genoma no interfieran con la expresión adecuada de dicho factor de silenciamiento. En los ejemplos de la presente invención, que no constituyen limitación, dicha inserción es una sustitución de la región de E3 del adenovirus o una inserción entre el promotor E4 y la ITR derecha. Son conocidas en la técnica construcciones de ADN para generar adenovirus recombinantes con inserciones en la región E3, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, pBHG10 y pBHG11 (Bett y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994): 8802-8806), y se describe en el ejemplo 1 una construcción para generar adenovirus recombinantes con inserciones entre el promotor E4 y la ITR derecha, y se pueden hacer inserciones en otros lugares del genoma del adenovirus utilizando métodos estándar de biología molecular conocidos en la técnica. En situaciones específicas, para la expresión adecuada de dicho marco de lectura abierto es preferente proteger dicha secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento vinculado funcionalmente a las secuencias de ADN reguladoras de otras secuencias de ADN reguladoras presentes en dicho genoma del adenovirus colocando a los lados de dicha secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento vinculado funcionalmente a las secuencias de ADN reguladoras elementos denominados aislantes (Steinwaerder y Lieber, Gene Therapy 7 (2000): 556-567). En otra variación de la presente invención, dicha secuencia de ADN que codifica

un factor de silenciamiento se inserta en lugar de un gen de adenovirus, en la que es preferente que dicho gen de adenovirus se exprese durante la fase tardía de la replicación del adenovirus, y en el que es preferente además que dicho gen de adenovirus esté funcionalmente ligado al MLP endógeno.

5 Debe entenderse que la presente invención incluye además adenovirus competentes en replicación, según la presente invención, que comprenden además una o más modificaciones adicionales para cambiar sus características, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, un cambio de tropismo mediante pseudotipado o dirección hacia dianas, tal como por ejemplo describen Krasnykh y otros (Mol. Ther. 1 (2000): 391-405), Suzuki y otros (Clin. Cancer Res. 7 (20012): 120-126), Van Beusechem y otros (Gene Ther. 10 (2003): 1982-1991) y Havenga y otros (J. Virol 76 (2002): 4612-4620), expresión de uno o más transgenes, tales como por ejemplo, un gen que codifica una citoquina, una proteína proapoptótica, una proteína antiangiogénica, una proteína de membrana fusogénica o una enzima que se convierte en profármaco, o mutaciones que aumentan su potencial de replicación, tales como por ejemplo, conservación de la región E3 (Suzuki y otros, Clin. Cancer Res. 8 (2002): 3348-3359) o la delección del gen E1B 19K (Sauthoff y otros Hum. Gene Ther. 11 (2000): 379-388), o su selectividad de replicación en un determinado tipo de células, entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación, las modificaciones para hacer CRAd (*supra*), o las que reducen su inmunogenicidad (es decir, su potencia para inducir una respuesta inmune cuando se introducen en un cuerpo animal), tal como por ejemplo, conservación de la región E3B (Wang y otros, Nature Biotechnol. 21 (2003): 1328-1335).

20 Los adenovirus competentes en replicación de la presente invención se producen utilizando métodos de la biología molecular, virología y biología celular conocidos en la técnica. Una manera de producir los adenovirus competentes en replicación según la presente invención se describe en detalle en la sección de ejemplos. Debe entenderse, sin embargo, que esta descripción no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la presente invención. Los expertos en la materia será capaz de obtener adenovirus competentes en replicación de la presente invención utilizando otros métodos o mediante la utilización de las variaciones de los métodos descritos en la presente memoria descriptiva.

En otra realización, la presente invención da a conocer métodos para identificar un factor inhibidor de adenovirus que es un diana útil para silenciar a los adenovirus competentes en replicación de la presente invención, mediante la comparación del tiempo de replicación o la capacidad lítica de un adenovirus competente en replicación en un primer tipo de células huésped, en el que dicho factor inhibidor de adenovirus se silencia por un factor de silenciamiento, con el tiempo de replicación o la capacidad lítica de dicho adenovirus competente en replicación en un segundo tipo de células huésped, en el que dicho factor inhibidor de adenovirus no se silencia por un factor de silenciamiento, pero que por otra parte es idéntico a dicho primer tipo de células huésped, y mediante la observación de un tiempo de replicación más corto o una capacidad lítica más rápida en dicho primer tipo de células huésped que en dicho segundo tipo de células huésped. Por ejemplo, las diferencias en el tiempo de replicación de los adenovirus competentes en replicación en dos tipos de células huésped se puede medir utilizando un adenovirus competente en replicación que expresa un gen marcador, tal como por ejemplo el gen de la luciferasa de luciérnaga, regulado por el MLP. En este caso, la expresión de luciferasa en dichas células huésped depende de la replicación de dicho adenovirus competente en replicación. Típicamente, la expresión de la luciferasa por un virus de este tipo que se está replicando en células huésped aumentará más de 100 veces o incluso más de 1000 veces hasta que la replicación se completa. En este caso, una medición adecuada de la velocidad de replicación de adenovirus es el tiempo necesario para alcanzar el 10% del valor máximo de la actividad de la luciferasa. La actividad luciferasa se controla en el tiempo por un método conocido en la técnica, que incluye, sin que constituya limitación, el Sistema de Ensayo Quimioluminiscente de Luciferasa (Promega) o el ReportaLight Plus Kit (Cambrex), y se identifica un primer tipo de células huésped en las que la actividad de la luciferasa aumenta más rápidamente que en dicho segundo tipo de células huésped. Más rápidamente significa en este caso, como mínimo, en el 10% menos de tiempo, preferentemente, como mínimo, el 20% menos de tiempo y, más preferentemente, como mínimo, el 50% por ciento menos de tiempo. A continuación, el factor que se está silenciando en dicho primer tipo de células huésped, pero no en dicho segundo tipo de células huésped se identifica como un factor inhibidor de adenovirus. Las diferencias en la capacidad lítica se pueden medir, por ejemplo, por el seguimiento en el tiempo de la lisis de dichas células huésped infectadas con un adenovirus competente en replicación, utilizando uno de los muchos métodos conocidos en la técnica, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, el bioensayo ToxiLight (Cambrex), e identificando un primer tipo de células huésped en el que la lisis es más rápida que en dicho segundo tipo de células huésped. En este caso, una medición conveniente de la capacidad lítica de un adenovirus es el tiempo necesario para lisar el 50% de las células infectadas, es decir, el tiempo necesario para alcanzar el 50% del valor máximo del compuesto marcador medido en el ensayo de citotoxicidad utilizado. También en este caso más rápidamente significa, como mínimo, en el 10% menos de tiempo, preferentemente, como mínimo, el 20% menos de tiempo y, más preferentemente, como mínimo, el 50% menos de tiempo. A continuación, el factor que se está silenciando en dicho primer tipo de células huésped, pero no en dicho segundo tipo de células huésped se identifica como un factor inhibidor de adenovirus. En una variación de esta realización, dicho primer tipo de células huésped contiene más de un factor de silenciamiento, en las que dichos factores de silenciamiento tienen cada uno una secuencia diana diferente en el mismo gen diana.

65 En una variación de la presente invención, la interferencia de ARN por el factor de silenciamiento en dichos métodos para identificar un factor inhibidor de adenovirus se realiza mediante la transfección de ARNpi en dicho primer tipo

de células huésped. En otra variación, la interferencia del ARN por el factor de silenciamiento en dicho método para identificar un factor inhibidor de adenovirus se realiza mediante la transfección de dicho primer tipo de células huésped con un vector plasmídico que expresa ARNhc. En aún otra variación, la interferencia de ARN por el factor de silenciamiento en dicho método para identificar un factor inhibidor de adenovirus se realiza por la transducción de dicho primer tipo de células huésped con un vector viral que expresa ARNhc. Entre los ejemplos que no constituyen limitación de vectores virales útiles en esta variación de la presente invención se incluyen vectores obtenidos a partir de retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus del herpes simple, virus del simio 40, virus de Epstein Barr, virus vacuna y virus adeno asociado.

En una variación de la presente invención, dichos métodos para identificar un factor inhibidor de adenovirus se realizan en un formato funcional de genómica de alto rendimiento en el que dicho factor de silenciamiento es parte de una biblioteca de factores de silenciamiento que comprende una matriz de factores de silenciamiento con especificidades de diana diferentes. En una variación preferente, cada uno de los componentes de dicha matriz comprende más de un factor de silenciamiento, en la que cada factor de silenciamiento en uno de los componentes de dicha matriz tiene una secuencia diana diferente en el mismo gen diana.

En otra realización, la presente invención da a conocer métodos para seleccionar un factor de silenciamiento útil para su incorporación en los adenovirus competentes en replicación según la presente invención, mediante la ejecución de un método para identificar un factor inhibidor de adenovirus según la presente invención y la selección de un factor de silenciamiento que después de haber sido introducido en una célula huésped provoca un tiempo de replicación más corto o una capacidad lítica más rápida de un adenovirus competente en replicación.

En una variación de la presente invención, dichos métodos para seleccionar un factor de silenciamiento útil para su incorporación en los adenovirus competentes en replicación según la presente invención se hace en un formato funcional de genómica de alto rendimiento, en el que dicho factor de silenciamiento es parte de una biblioteca de factores de silenciamiento que comprende una matriz de factores de silenciamiento con diferentes especificidades de diana. En una variación preferente, cada uno de los componentes de dicha matriz comprende más de un factor de silenciamiento, en la que cada factor de silenciamiento en uno de los componentes de dicha matriz tiene una secuencia diana diferente en el mismo gen diana. En esta variación, dichos métodos comprenden una primera etapa en la que se selecciona un componente de la matriz que comprende uno o más factores de silenciamiento útiles para la presente invención y una segunda etapa en la que se selecciona un factor de silenciamiento útil para la presente invención a partir de dichos más de un factor de silenciamiento presentes en dicho componente de la matriz seleccionado.

Debe entenderse que los métodos para identificar un factor inhibidor de adenovirus o para seleccionar un factor de silenciamiento útil para su incorporación en adenovirus competentes en replicación según la presente invención no requieren necesariamente un conocimiento a priori de la naturaleza de dicho factor inhibidor de adenovirus o factor de silenciamiento, ni de los procesos biológicos mediante los cuales dicho factor inhibidor de adenovirus inhibe la replicación de los adenovirus o la lisis de la célula huésped inducida por adenovirus. El simple hecho de que dicho factor inhibidor de adenovirus retrasa la replicación de los adenovirus o la lisis de la célula huésped inducida por adenovirus o que dicho factor de silenciamiento acelera la replicación de los adenovirus o la lisis de la célula huésped inducida por adenovirus los hace, respectivamente, un factor inhibidor de adenovirus o un factor de silenciamiento útiles para su incorporación en adenovirus competentes en replicación según la presente invención.

La presente invención da a conocer además formulaciones que comprenden adenovirus competentes en replicación según la presente invención que se pueden utilizar para conservar dichos adenovirus competentes en replicación y administrar dichos adenovirus competentes en replicación a las células. Dichas formulaciones comprenden preferentemente dicho adenovirus competente en replicación y un diluyente. Dicho diluyente permite el almacenamiento de dicho adenovirus competente en replicación por un tiempo prolongado y/o la administración de dicho adenovirus competente en replicación a las células en un cultivo y/o a las células en un cuerpo animal, en el que es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. Es preferente que dicho diluyente permita el almacenamiento en condiciones de liofilización. Es preferente además que dicho diluyente permita tanto el almacenamiento como la administración de dicho adenovirus competente en replicación a las células en un cultivo y/o a las células en un cuerpo animal. Se debe entender que "permitir el almacenamiento" significa que durante el almacenamiento de dicha formulación la capacidad de dicho adenovirus competente en replicación para infectar una célula se mantiene con una vida media mayor de una semana, en la que es preferente que dicha vida media sea mayor de un mes, y en la que es más preferente que dicha vida media sea mayor de 6 meses. Dicho almacenamiento puede ser a cualquier temperatura por debajo de 40°C, pero es preferente que dicha temperatura esté entre 1°C y 10°C, o que dicha temperatura sea inferior a 60°C negativos. Debe entenderse que dicha administración a las células en un cultivo y/o a las células en un cuerpo animal significa que dicha formulación y dichas células se ponen en contacto dando lugar a la introducción de dicho adenovirus competente en replicación en dichas células. Es preferente que dicho diluyente no sea tóxico para dichas células y para dicho cuerpo animal. La presente invención no dicta la composición exacta de dicho diluyente, pero son conocidos en la técnica varios diluyentes útiles a los propósitos de la presente invención. Ejemplos que no constituyen limitación de diluyentes útiles en la presente invención se describen en el documento WO 03/057892. Opcionalmente, dicho diluyente puede completarse además con componentes adicionales para aumentar la estabilidad física de dicho adenovirus

competente en replicación durante el almacenamiento, para aumentar dicha introducción en dichas células, o para mejorar la administración de dicho adenovirus recombinante a dichas células en un cuerpo animal. Dichos componentes pueden ser diferentes para cada utilización específica de dicha formulación. Se describen ejemplos que no constituyen limitación de dichos componentes adicionales en el documento WO 03/057892. Los técnicos en la materia serán capaces de definir mediante la investigación adecuada los diluyentes y suplementos útiles para preparar una formulación según la presente invención que dé como resultado la introducción de dicho adenovirus competente en replicación en las células para cada utilización particular de la presente invención y cada método particular de administración según la presente invención.

La presente invención da a conocer además métodos para administrar las formulaciones según la presente invención a las células, dando lugar a la introducción de los adenovirus competentes en replicación de la presente invención en dichas células. En una variación, los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a las células *in vitro*, en otra variación los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a las células *in vivo*. Los métodos de la presente invención no se diferencian en nada de los conocidos en la técnica para administrar otros adenovirus recombinantes a las células. En general, los adenovirus competentes en replicación de la presente invención se diluyen para alcanzar una concentración útil en un diluyente según la presente invención. Generalmente, dicho diluyente es isotónico con las condiciones en un cuerpo animal, pero en algunos casos puede ser deseable utilizar un disolvente a una concentración no isotónica. Dicha concentración útil de dicho adenovirus competente en replicación será diferente para cada utilización de la presente invención. Los técnicos expertos serán capaces de determinar dicha concentración útil mediante experimentación. Dicha formulación se pone en contacto con dichas células ya sea en condiciones estáticas, tales como en el caso de la administración a las células en un cultivo o en el caso de inyección a un tejido animal, o en condiciones dinámicas, tales como en el caso de la inyección en la circulación sanguínea de un cuerpo animal. Dicha formulación y dichas células se ponen en contacto a una temperatura entre 0°C y 40°C, en la que es preferente que dicha temperatura esté entre 30°C y 40°C. En caso de que dicha formulación se administre a un cuerpo animal, es preferente que dicha formulación y dichas células se pongan en contacto a la temperatura existente en dicho cuerpo animal. En una variación de la presente invención, dicha administración se realiza a una presión atmosférica ambiente. En otra variación de la presente invención, dicha administración se realiza a una presión superior a la presión atmosférica. En otra variación de la presente invención, dicha administración se hace por infusión muy lenta, también conocida como Liberación de Convección Mejorada ("Convection-Enhanced Delivery") (Voges y otros, Ann. Neurol. 54 (2003): 479-487; Bankiewicz y otros, Exp. Neurol. 164 (2000): 2-14). Dicho contacto se mantiene durante un período de tiempo suficientemente largo para permitir la introducción de dichos adenovirus competentes en replicación en dichas células.

La presente invención da a conocer además composiciones de un adenovirus competente en replicación que comprende, como mínimo, un marco de lectura abierto para un factor de silenciamiento según la presente invención y células en las que se replica dicho adenovirus competente en replicación. Dichos adenovirus competentes en replicación tienen una gama de huéspedes que permiten la replicación en dichas células. En una variación preferente de la presente invención, dichas células son células que han perdido la capacidad para responder a una pérdida del punto de control del ciclo celular experimentando muerte celular programada. En ejemplos particulares de esta variación de la presente invención, dichas células son células de la artritis reumatoide o células cancerosas. A los efectos de la presente invención, los términos "células cancerosas" y "células tumorales" se definen como células que han perdido el control adecuado del crecimiento celular, dando lugar a un crecimiento descontrolado y/o replicación de dichas células en el cuerpo de un mamífero, por ejemplo, o a una aceleración del crecimiento/replicación o a inmortalidad *in vitro*. De este modo, el término incluye las células cancerosas malignas, premalignas y benignas. En una variación preferente de la presente invención no excluyente, dichas células son células humanas. En otra variación no excluyente de la presente invención, dichas células son las células en un cuerpo animal, en la que es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. Las composiciones de la presente invención se obtienen mediante la administración de una formulación que contiene un adenovirus competente en replicación según la presente invención a dichas células mediante un método según la presente invención.

En una realización de la presente invención, dichas células que forman parte de una composición según la presente invención, son células en un tumor sólido. En una variación de esta realización, dicho tumor se mantiene en cultivo *in vitro*. En esta variación de la presente invención, dicho tumor puede haberse obtenido artificialmente a partir de células cancerosas, tales como, por ejemplo, un esferoide obtenido a partir de una línea celular, o dicho tumor puede haberse obtenido a partir de un explante de un tumor en un cuerpo animal. En otra variación de esta realización, dicho tumor se encuentra en un cuerpo animal. En esta variación de la presente invención, dicho tumor puede implantarse quirúrgicamente en dicho cuerpo animal o dicho tumor puede haber surgido en dicho cuerpo animal. En este último caso, es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. En esta realización de la presente invención, es preferente que dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida den como resultado una propagación lateral acelerada de dicho adenovirus competente en replicación desde las células infectadas a las células vecinas en dicho tumor, en comparación con adenovirus competentes en replicación carentes del factor de silenciamiento según la presente invención. En este aspecto de la presente invención, es preferente además que dicho tiempo de replicación corto, capacidad lítica rápida y/o propagación lateral acelerada conduzca a una destrucción más eficaz de dicho tumor o la inhibición del crecimiento del mismo.

En otra realización de la presente invención, dichas células que forman parte de una composición según la presente invención, son células sinoviales reumatoides. En una variación de esta realización, dichas células sinoviales reumatoides se mantienen en cultivo *in vitro*. En otra variación de esta realización, dichas células sinoviales reumatoides están presentes en un cuerpo animal, en el que es preferente que dichas células sinoviales reumatoides estén presentes en una articulación inflamada de forma crónica y en la que es preferente además que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. En esta realización de la presente invención, es preferente que dicho tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida dé como resultado una propagación lateral acelerada de dichos adenovirus competentes en replicación desde las células infectadas a las células vecinas en dicha articulación inflamada, en comparación con los adenovirus competentes en replicación que carecen del factor de silenciamiento según la presente invención. En este aspecto de la presente invención, es preferente además que dichos tiempo de replicación corto, capacidad lítica rápida y/o propagación lateral acelerada conduzcan a una destrucción más eficaz de dichas células sinoviales reumatoides o a la inhibición del crecimiento de las mismas.

En aún otra realización de la presente invención, dichas células que forman parte de una composición según la presente invención, son células musculares lisas vasculares. En una variación de esta realización, dichas células musculares lisas vasculares se mantienen en un cultivo *in vitro*. En otra variación de esta realización, dichas células musculares lisas vasculares están presentes en un cuerpo animal, en el que es preferente que dichas células musculares lisas vasculares estén presentes en un área de hiperplasia íntima, tal como por ejemplo, en la aterosclerosis, restenosis u oclusión vascular del injerto, y en la que es preferente además que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. En esta realización de la presente invención, es preferente que dichos tiempo de replicación corto y/o capacidad lítica rápida den como resultado una propagación lateral acelerada de dichos adenovirus competentes en replicación desde las células infectadas a las células vecinas en dicha zona de hiperplasia íntima, en comparación con los adenovirus competentes en replicación carentes del factor de silenciamiento según la presente invención. En este aspecto de la presente invención, es preferente además que dichos tiempo de replicación corto, capacidad lítica rápida y/o propagación lateral acelerada conduzcan a una destrucción más eficaz de dichas células musculares lisas vasculares o a la inhibición del crecimiento de las mismas.

La presente invención contempla además la utilización de los adenovirus competentes en replicación, métodos y formulaciones según la presente invención para el tratamiento de una enfermedad que implica la supervivencia celular inadecuada, en la que es preferente que dicha enfermedad sea una enfermedad en un ser humano. Un tratamiento según la presente invención comprenderá la administración de un adenovirus competente en replicación según la presente invención, en una formulación según la presente invención, a células enfermas en un cuerpo animal con un método según la presente invención. En una realización particular de la presente invención dicha enfermedad es el cáncer y dichas células enfermas son células cancerosas, en las que es preferente que dichas células cancerosas sean parte de un tumor sólido o una metástasis tumoral. Dependiendo del tipo de enfermedad y la naturaleza de las células enfermas, se elegirán un adenovirus competente en replicación útil, una formulación útil y una ruta de administración útil. Con respecto a dicho adenovirus competente en replicación, puede seleccionarse un factor de silenciamiento útil en base a una investigación previa, pero preferentemente también en base al conocimiento de los antecedentes genéticos de dicha enfermedad en general o, más preferentemente, a los antecedentes genéticos de dichas células enfermas en particular. Se elegirán una formulación y ruta de administración útiles en base a los conocimientos sobre la localización de dichas células enfermas en dicho cuerpo animal, las características de dichas células enfermas y las características de otras células presentes en la parte de dicho cuerpo animal al que se administra dicha formulación. Entre los ejemplos que no constituyen limitación de dicha ruta de administración se incluyen la inyección directa en un tejido que contiene células enfermas, por ejemplo, por liberación de convección mejorada, administración oral, inyección en la circulación sanguínea, inhalación, inyección en una cavidad corporal, tal como la cavidad pleural o peritoneal, una articulación o un ventrículo del cerebro, la inyección en el lumen de una parte del tracto gastrointestinal o urogenital, y su aplicación a la superficie de una zona del cuerpo determinada, tal como la piel o la mucosa otolaríngea, por ejemplo por medio de un enjuague bucal. Si dicha ruta de administración es a través de la inyección en la circulación sanguínea, es preferente que dicha inyección se realice en una arteria que conduzca a una parte de dicho cuerpo animal que contiene dichas células enfermas.

La presente invención contempla además que un tratamiento de una enfermedad según la presente invención se combine con otros métodos y medios conocidos en la técnica para matar a una población de células enfermas, entre los que se incluyen, sin que constituyan limitación, irradiación, introducción de genes que codifican proteínas tóxicas, tales como por ejemplo la toxina de la difteria o de pseudomonas, o proteínas proapoptóticas tales como Apoptina o Ligando Inductor de Apoptosis relacionado con el TNF, o enzimas que convierten profármacos tales como timidina quinasa, citosina desaminasa o carboxilesterasa, o citoquinas, tales como la interleuquina-2, interleuquina-12 o GM-CSF, o productos antiangiogénicos tales como endostatina o angiostatina, o proteínas fusogénicas de membrana, tales como por ejemplo los derivados del Virus de Inmunodeficiencia Humana, coronavirus o el Virus de la Leucemia del Gibón y la administración de compuestos químicos, anticuerpos, antagonistas de receptores, inhibidores de señalización, moléculas inhibidoras de interacciones proteína-proteína, tales como por ejemplo la interacción entre p53 y un antagonista de p53 o entre un componente de la ruta de p53 y un inhibidor de la ruta de p53, y similares. Se prevé que este tratamiento combinado puede dar como resultado una muerte más eficaz de dicha población de células enfermas que cualquier tratamiento único. Además, un tratamiento puede potenciar el efecto del otro tratamiento. Por ejemplo, se sabe que la irradiación y ciertos compuestos químicos inducen la muerte celular

programada. Por lo tanto, estos tratamientos pueden potenciar la lisis celular y la liberación eficaz de la progenie de virus de un adenovirus competente en replicación, que restaura la muerte celular programada silenciando un inhibidor de la muerte celular programada, según la presente invención.

5 A partir de aquí, la presente invención se ejemplifica de forma adicional en los ejemplos y figuras. Los diversos ejemplos muestran un número de modos de proporcionar dichos adenovirus competentes en replicación, formulaciones, métodos, composiciones, y utilizaciones según la presente invención. Debe entenderse claramente que la descripción no pretende de ninguna manera limitar el alcance de la presente invención, tal como se ha explicado anteriormente de manera general. Técnicos calificados podrán transferir las enseñanzas de la presente
10 invención a otros adenovirus competentes en replicación, factores de silenciamiento, formulaciones, métodos, composiciones, y utilizaciones sin apartarse de la presente invención.

Descripción de las figuras.

15 Figura 1. (A) Adenovirus de replicación condicional que codifican ARNhc silencian la expresión de un gen diana. Silenciamiento inducido por CRAd-ARNhc de luciferasa de luciérnaga en cuatro líneas celulares humanas. Las células se infectaron con los CRAd indicados seguido inmediatamente por una transfección con el plásmido reportero phAR-FF-RL y se analizó el silenciamiento 30 horas después de la infección. Se normalizaron las proporciones de actividad de luciferasa de luciérnaga con respecto a actividad de luciferasa de Renilla con respecto a la proporción que se obtiene después de la infección con el virus de control Ad5-Δ24E3. Los datos mostrados son los resultados promedio ± desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. (B) Curso temporal del silenciamiento inducido por CRAd-ARNhc de luciferasa de luciérnaga en las células A549. Las células se infectaron bien con Ad5-Δ24E3 o bien con Ad5-Δ24E3.Ff1-R y se analizaron en diversos puntos temporales después de la infección. En cada punto temporal, se normalizó la proporción de actividad de luciferasa de luciérnaga con respecto a la actividad de luciferasa de Renilla obtenida con Ad5-Δ24E3.Ff1-R con respecto a la del virus Ad5-Δ24E3. Los datos mostrados son los resultados promedio ± desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado. (C) El silenciamiento inducido por CRAd-ARNhc de la luciferasa de luciérnaga es específico de secuencia. Se infectaron células A549 con los CRAd indicados seguido inmediatamente por una transfección con el plásmido reportero phAR-FF-RL o el plásmido mutado phAR-FF*-RL y se analizaron tal como en (A). Los datos mostrados son los resultados promedio ± desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

35 Figura 2. Influencia del inhibidor de ciclo celular apigenina en la expresión de la luciferasa de un adenovirus recombinante. Se infectaron células A549 con Ad5-Δ24-SA-Luc, Ad5-Δ24-CMV-Luc o Ad5ΔE1-CMV-Luc a un MOI de 20 PFU/célula y se cultivaron en presencia de cantidades crecientes de apigenina. Treinta y dos horas después de la infección, las células se lisaron y se determinaron las actividades de la luciferasa. Los datos mostrados son los resultados promedio ± desviación estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

40 Figura 3. Restauración de la función de p53 en células que expresan el antagonista de p53 VPH18E6 mediante un adenovirus competente en replicación que expresa p53 y un ARNhc direccionado contra VPH18E6. Se transfectaron células de cáncer cervical HeLa VPH18-positivas con reportero p53, construcción PG13-Luc y 24 horas después se infectaron con AdΔ24, AdΔ24-p53, o AdΔ24.p53(L).H1_18E6. Setenta y dos horas después de la infección se lisaron las células y se determinaron las actividades de la luciferasa. Se normalizaron los valores en base a controles de infección simulada. Los datos mostrados son los resultados promedio de un experimento representativo realizado por triplicado.

45 Figura 4. Aumento específico de replicación lítica de adenovirus en células que expresan el antagonista de p53 VPH18E6 mediante un adenovirus competente en replicación que expresa p53 y un ARNhc direccionado contra VPH18E6. Se infectaron células MDA-MB-231 VPH negativas (A), células SiHa VPH16 positivas (B) y células HeLa VPH18 positivas (C) con AdΔ24, AdΔ24-p53, o AdΔ24.p53(L).H1_18E6 con un intervalo de dosis virales tal como el que se indica. Después de cultivo durante 20 días, las células remanentes que sobrevivieron a la replicación lítica del adenovirus se tiñeron. MOI, multiplicidad de la infección, es decir, el número de virus infecciosos por célula en la inoculación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de vectores lanzadera “shuttle vectors” de adenovirus que portan un casete de destino de recombinación Gateway

60 Para construir un vector lanzadera que porta un casete de destino de recombinación Gateway entre la región E4 del adenovirus y la ITR derecha, se utilizó la construcción de pEndK/Spel (proporcionada generosamente por el Dr. R. Alemany, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, España). La pEndK/Spel se realizó digiriendo en primer lugar pTG3602 (Chartier y otros, J. Virol, 70 (1996): 4805-4810) con KpnI y religando el fragmento del vector que comprende las unidades de Ad5 de mapeo 0-7 y 93-100 para crear pEndK. A continuación, se introdujo un sitio Spel
65 único en pEndK cambiando en Ad5 el nucleótido 35813 de A a T mediante mutagénesis dirigida para crear

pEndK/Spel. El pEndK/Spel porta dos sitios de restricción Pacl que flanquean las dos ITR de Ad5. Se hizo compatible a pEndK/Spel con el sistema Gateway mediante el ligado del casete de destino rfa Gateway (Gateway Vector Conversion System, Invitrogen, Carlsbad, CA) como un fragmento como en el sitio Spel (rellenado con la polimerasa Klenow). Se seleccionaron plásmidos que contenían el casete de destino Gateway con la secuencia de codificación del gen de ccdB en la cadena R o L del adenovirus y se designaron pEndK/DEST-R y pEndK/DEST-L, respectivamente.

Para construir un vector lanzadera que porta un casete de destino de recombinación Gateway en lugar de la región E3 del adenovirus, el casete de destino rfa GATEWAY (del sistema Gateway Vector Conversion System) se clonó en primer lugar en pBluescript SK(-) (Stratagene), se digirió con EcoRV para obtener pBSK-DEST. A partir de esta plantilla, se amplificó el casete DEST por PCR utilizando cebadores 5'-GAGGTCGACGCGATCGATAAGCTTGATATC-3' y 5'-TAGAACTAGTCGATCGCCCGGGCTGCAG-3' con sitios PvuI sobresalientes y se digirió con PvuI. Este fragmento se ligó en pBHG11 (Microbix), digerido con Pacl para obtener pBHG11-DEST_R.

Para construir un vector lanzadera que porta el genoma de longitud completa de un CRAd con un casete de destino de recombinación Gateway en lugar de la región E3 del adenovirus, primero se digirió pEndK/Spel (*supra*) con EcoRV y el fragmento EcoRV que comprende el gen de fibra ("fiber gene") de pBHG11 se insertó en pEndK-Fibra. A continuación, el fragmento HpaI que contiene DEST_R a partir de pBHG11-DEST_R se insertó en pEndK-Fibra digerido con HpaI para crear pEndK-Fibra_DEST_R. Por último, el fragmento de Fibra_DEST_R que contiene el fragmento Spel a partir de pEndK-Fibra_DEST_R se insertó en pAdΔ24E3 (véase el ejemplo 7) digerido con Spel para reemplazar la región E3 y el gen de fibra con el fragmento de DEST_R_Fibra a partir de pEndK-Fibra_DEST_R. El plásmido resultante es pAdΔ24-DEST_R.

Ejemplo 2. Método general para la construcción de plásmidos con un casete de expresión ARNhc que pueden ser transportados en un vector lanzadera de adenovirus según el ejemplo 1 mediante recombinación Gateway.

El plásmido pSHAG-1 (Paddison y otros, Genes Dev. 16 (2002) 948-958; proporcionado generosamente por el Dr. G.J. Hannon, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York) se utiliza como clon de entrada para el sistema GATEWAY (Invitrogen, Carlsbad, CA). pSHAG-1 contiene un casete de expresión impulsado por el promotor U6 flanqueado por los sitios de recombinación attL1 y attL2 de tal manera que el casete de expresión puede transportarse en vectores plásmidos de destino que incluyen pEndK/DEST-R, pEndK/DEST-L, pBHG11-DEST_R y pAdΔ24 DEST_R del ejemplo 1, utilizando el sistema Gateway. Las secuencias de codificación de ARNhc se pueden introducir por el enlace de pSHAG-1 digerido con BseRI y BamHI con dos oligonucleótidos sintéticos hibridados con secuencias de ADN sobresalientes compatibles. El primero de los dos oligonucleótidos debe ser diseñado para contener en el orden 5' a 3': un primer tramo, como mínimo, de 19 y preferentemente no más de 29 nucleótidos complementarios a los del ARNm diana (es decir, antisentido), una secuencia de bucle, un segundo tramo de nucleótidos de la misma longitud y de secuencia complementaria inversa al primer tramo de nucleótidos, y un tramo, como mínimo, de 4 timidinas. El segundo oligonucleótido debe ser inversamente complementario al primer oligonucleótido. Además, cuando se hibridan los oligonucleótidos de doble cadena deben formar sitios sobresalientes compatibles con los sitios de restricción BseRI y BamHI. Dependiendo de la elección de la secuencia de 19 a 29 nucleótidos, se puede preparar un ARNhc útil para la presente invención dirigido contra una diana a elección. Por ejemplo, secuencias de oligonucleótidos útiles para fijar como diana de la luciferasa de luciérnaga son las siguientes: 1: 5'-GATTCCAATTCAGCGGGAGCCACCTG ATgaagcttgATCGGGTGGCTCTCGCTGAGTTGGAA TCCATTTTTT-3' y el oligonucleótido 2: 5'-GATCAAAAAATGGATTCCAACCTCAGCGAGAGCCACCC GATcaagcttcATCAGGTGGCTCCC GCTGAATTGGAATCCG-3', en la que las letras minúsculas representan la secuencia del bucle. La hibridación de los oligonucleótidos 1 y 2 seguida del enlace en pSHAG-1 digerido con BseRI y BamHI da como resultado la formación de pSHAG-ARNhc. En el caso del ejemplo del ARNhc específico de luciferasa esto da como resultado un pSHAG-Ff1 que codifica un ARNhc homólogo a los nucleótidos 1340 a 1368 de la secuencia de codificación del gen de la luciferasa de luciérnaga.

Ejemplo 3. Métodos generales para la construcción de vectores lanzadera de adenovirus que portan un casete de expresión ARNhc utilizando los plásmidos de los ejemplos 1 y 2.

Para construir un vector lanzadera adenoviral que porta un casete de expresión de ARNhc insertado entre la región E4 y la ITR derecha, el casete de expresión de ARNhc se transfiere desde la construcción pSHAG-ARNhc del ejemplo 2 al plásmido pEndK/DEST-R o pEndK/DEST-L del ejemplo 1, mediante una reacción de recombinación *in vitro* GATEWAY LR utilizando la mezcla de enzimas Clonase GATEWAY LR (Invitrogen), según el protocolo del fabricante. Esto da como resultado el pEndK/ARNhc-R o pEndK/ARNhc-L. Por ejemplo, pSHAG-Ff1 se recombina con pEndK/DEST-R o pEndK/DEST-L creando pEndK Ff1-R o pEndK-Ff1 L, respectivamente.

Para construir un vector lanzadera de adenovirus que porta un casete de expresión de ARNhc insertado en lugar de la región E3, el casete de expresión del ARNhc se transfiere desde la construcción pSHAG-ARNhc del ejemplo 2 al plásmido pBHG11-DEST_R del ejemplo 1 mediante la misma reacción de recombinación *in vitro* GATEWAY LR para crear pBHG11-ARNhc. Para la construcción de un plásmido que porta el genoma de longitud completa de un CRAd de tipo AdΔ24 (Fueyo y otros, Oncogene 19 (2000): 2-12) con un casete de expresión de ARNhc insertado en lugar

de la región E3 del adenovirus, el casete de expresión del ARNhc se transfiere desde la construcción pSHAG-ARNhc del ejemplo 2 al plásmido pAd Δ 24 DEST_R del ejemplo 1, mediante la misma reacción de recombinación *in vitro* GATEWAY LR para crear pAd Δ 24-ARNhc.

5 Ejemplo 4. Métodos generales para la construcción de adenovirus competentes en replicación que expresan moléculas de ARNhc con un plásmido según el ejemplo 3.

Los plásmidos pEndK/ARNhc-R y pEndK/ARNhc-L se pueden hacer lineales con KpnI y/o EcoRV. Esto separa las unidades 0-7 del mapa Ad5 de las unidades 93-100 del mapa Ad5 con el casete de expresión ARNhc insertado. Estas moléculas linealizadas se pueden recombinar en bacterias, por ejemplo en *E. coli* BJ5183, con ADN de adenovirus competente en replicación de longitud completa. Dicho ADN de adenovirus competente en replicación de longitud completa puede ser aislado de las partículas de adenovirus o, de forma alternativa puede ser liberado por digestión a partir de un plásmido que porta una inserción de ADN de adenovirus competente en replicación de longitud completa. A continuación, la doble recombinación homóloga crea un plásmido con una inserción del genoma de adenovirus competente en replicación de longitud completa, en el que se ha insertado el casete de expresión de ARNhc entre la región E4 y la ITR derecha. Debe señalarse que puede utilizarse cualquier adenovirus competente en replicación de longitud completa para insertar casetes de expresión de ARNhc según este método, incluyendo adenovirus recombinantes con modificaciones adicionales, tales como por ejemplo una selectividad tumoral o potencial oncolítico aumentados, un tropismo o inserción transgénica cambiados. Es preferente, sin embargo, que dicho adenovirus competente en replicación de longitud completa no incluya un sitio de restricción Pacl en su genoma. Posteriormente, el genoma completo del adenovirus competente en replicación con el casete de expresión de ARNhc insertado se libera del plásmido por digestión con Pacl. Este ADN se transfecta en células humanas utilizando, por ejemplo, el reactivo lipofectamina. El adenovirus recombinante competente en replicación resultante según la presente invención se aísla, se propaga adicionalmente y se purifica según los métodos de cultivo celular y virología estándar conocidos en la técnica.

Se transfectaron plásmidos pBHG11-ARNhc en células humanas junto con plásmidos pXC1 (Microbix Biosystems) o derivados de pXC1 con las modificaciones a elección, por ejemplo, en la región E1 para crear CRAd entre las que se incluyen, sin que constituyan limitación la mutación Δ 24 (*infra*), para permitir la recombinación homóloga reconstituyendo un genoma completo del adenovirus competente en replicación con el casete de expresión de ARNhc insertado en lugar de la región E3. A continuación, este virus puede aislarse, propagarse, purificarse y utilizarse según los métodos conocidos en la técnica. El plásmido pAd Δ 24-ARNhc se puede digerir con Pacl y transfectar en células humanas para aislar un CRAd de tipo Δ 24 con el casete de expresión del ARNhc insertado en lugar de la región E3. A continuación, este virus puede además aislarse, propagarse, purificarse y utilizarse según los métodos conocidos en la técnica.

30 Ejemplo 5. Construcción de adenovirus Ad5- Δ 24E3-Ff1-R y Ad5- Δ 24E3-Ff1-L de replicación condicional que silencian la luciferasa de luciérnaga.

El adenovirus de replicación condicional derivado de Ad5 (CRAd) Ad5- Δ 24E3 que porta a una eliminación de 24 pb en el dominio CR2 que se enlaza a pRb en E1A (Suzuki y otros, Clin. Cancer Res. 8 (2002): 3348-3359) se utilizó como eje principal para la construcción de CRAd que expresan moléculas de ARNhc contra la luciferasa de luciérnaga. Según el método general descrito en el ejemplo 4, se llevó a cabo la recombinación homóloga en *E. coli* BJ5183 entre el ADN viral de Ad5- Δ 24E3 de longitud completa y pEndK-Ff1-R o pEndK-Ff1-L digeridos con KpnI (véase el ejemplo 3) para formar los plásmidos pAd Δ 24E3-Ff1-R y pAd Δ 24E3-Ff1-L, respectivamente. Estos plásmidos se digirieron con Pacl para liberar el ADN adenoviral de longitud completa con la inserción del casete de expresión de ARNhc Ff1 desde el eje principal del plásmido y se transfectaron en células 293 humanas (Graham y otros, J. Gen. Virol. 36 (1977): 59-79). Se recolectaron los CRAd Ad5- Δ 24E3.Ff1-R y Ad5- Δ 24E3.Ff1-L y se propagaron adicionalmente en células A549 (obtenidas de la ATCC). La delección E1 Δ 24 y la inserción y orientación de U6-Ff1 se confirmaron por PCR en los productos finales y se determinaron las titulaciones funcionales de PFU por titulación de placas de dilución limitada en las células 293 según técnicas estándar.

50 Ejemplo 6. Silenciamiento específico de la luciferasa de luciérnaga por adenovirus de replicación condicional Ad5- Δ 24E3-Ff1-R y Ad5- Δ 24E3-Ff1-L en células de cáncer humanas.

A efectos de cuantificar con precisión la eficiencia de silenciamiento y compensar adecuadamente la variación experimental, los presentes inventores emplearon el plásmido reportero phAR-FF-RL, que expresa los genes de luciferasa de luciérnaga y *Renilla* a partir del promotor bidireccional hAR (Barski y otros Biotechniques 36 (2004): 382-4, 386, 388), permitiendo de este modo la normalización del silenciamiento de la luciferasa de luciérnaga en relación a la expresión de la luciferasa *Renilla*. Para la construcción de phAR-FF-RL, se obtuvo el promotor hAR (nt-124 a +29 en relación con el sitio de inicio de transcripción, número de acceso de Genbank AF112482) mediante PCR utilizando ADN genómico subclonado como plantilla y los cebadores 5'-CCAGAAAGCTCGCAACGTGGCATCTGCTA-3' y 5'-GTTTGGAGAGCTCCTGGGCACAATGAGGC-3', que crean sitios de flanco *SacI* (subrayados). El producto de PCR se insertó en el sitio *SacI* de pGL3-basic (Promega, Madison, WI) con el extremo 3' del promotor hacia el gen de luciferasa de luciérnaga, creando phAR-FF. A continuación, el

ADNc de luciferasa de *Renilla* se obtuvo mediante PCR utilizando pRL-TK (Promega) como plantilla y cebadores 5'-ACAACGGTACCGAACTTAAGCTGCAG-3' y 5'-CCGAAAGGTACCACCTGGATCCTTATC-3', que crean lugares de flanco *KpnI* (subrayados) y se insertó en el sitio *KpnI* de phAR-FF en una orientación opuesta a la del gen de luciferasa de luciérnaga, de modo que el extremo 5' del promotor hAR se enfrenta con el lado 5' del gen de luciferasa de *Renilla*.

Se obtuvieron células A549 de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, células MCF-7 de carcinoma de mama y células HeLa de carcinoma de cuello uterino humanas de la American Type Culture Collection (Manassas, Virginia). Las células SaOs-2 de osteosarcoma fueron un amable regalo del Dr. F. Van Valen (Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Alemania). Las células se mantuvieron en DMEM complementado con F12 con un 10% de suero fetal bovino, 50 UI ml⁻¹ de penicilina y 50 µg ml⁻¹ de estreptomycin (Life Technologies, Inc., Paisley, Reino Unido). Las líneas de células de cáncer humanas se colocaron al 50-70% de confluencia en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 50 ng de phAR-FF-RL y 250 ng de ADN portador de plásmido pBluescript(-)SK irrelevante (Stratagene, La Jolla, California) utilizando Lipofectamine Plus (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Las infecciones con el CRAd Ad5-Δ24E3 de control o con los CRAd Ad5-Δ24E3.Ff1-R o Ad5-Δ24E3.Ff1-L de silenciamiento (*supra*) se realizaron a una multiplicidad de infección de 500 PFU/célula durante 2 horas a 37°C, seguidas inmediatamente por la transfección. Se determinaron las actividades de la luciferasa de luciérnaga y *Renilla* 30 horas después de la infección utilizando el Sistema de Ensayo Reportero de Luciferasa Dual (Promega) según el protocolo del fabricante.

En las diferentes líneas celulares, ambos Ad5-Δ24E3.Ff1-R y Ad5-Δ24E3.Ff1-L suprimieron la expresión normalizada de luciferasa de luciérnaga, aproximadamente, del 60% al 30% del nivel de expresión observado después de la infección con el CRAd Ad5-Δ24E3 de control parental (Figura 1A). Esto demostró que los ARNhc expresados a partir de CRAd son capaces de suprimir la expresión de un gen diana en células huésped infectadas con dichos CRAd.

Debido a que los ARNhc están codificados por adenovirus que se replican, se suponía probable que como consecuencia de la replicación del genoma del virus su expresión se incrementaría en el tiempo. Experimentos piloto utilizando Ad5Δ24-CMV-Luc (ejemplo 10) revelaron que en las A549 un aumento exponencial de la expresión transgénica se inició a las 20 horas después de la infección para alcanzar a una meseta a 32 horas. Asumiendo que la expresión de los ARNhc impulsada por el promotor U6 sigue un perfil de expresión similar, los presentes inventores anticiparon que el efecto de silenciamiento inducido por los ARNhc aumentaría durante el ciclo de replicación. Para ensayar esto, los presentes inventores realizaron un experimento temporal midiendo el silenciamiento por Ad5-Δ24E3.Ff1-R en células A549 12, 24, 36 y 48 horas después de la infección. Este experimento demostró que el Ad5-Δ24E3.Ff1-R suprimió progresivamente la expresión de luciferasa de luciérnaga en las células A549 durante los dos primeros días después de la infección (figura 1B). A las 48 horas después de la infección, cuando se hizo evidente el CPE, el Ad5-Δ24E3.U6-Ff1-R había silenciado a la luciferasa de luciérnaga, aproximadamente, hasta el 30% del control Ad5-Δ24E3.

Dado que los valores de expresión de luciferasa de luciérnaga se normalizaron utilizando la expresión de la luciferasa de *Renilla* como control interno y los efectos de los CRAd que expresan ARNhc se compararon con la expresión después de la infección con el virus parental Ad5-Δ24E3, es poco probable que la supresión observada de expresión de la luciferasa de luciérnaga se deba a efectos no específicos provocados por la replicación viral. Sin embargo, para excluir formalmente esta posibilidad, los presentes inventores investigaron el silenciamiento de una luciferasa de luciérnaga mutante. Para este fin, los presentes inventores introdujeron seis mutaciones silenciosas puntuales en la secuencia diana del ARNhc en el gen de luciferasa de luciérnaga codificado por phAR-FF-RL. Los presentes inventores prepararon un plásmido reportero de control phAR-FF*-RL que es similar al phAR-FF-RL, pero que contiene mutaciones silenciosas en el lugar de reconocimiento de diana de la luciferasa de luciérnaga, cambiando la secuencia de reconocimiento a: 5'-ACCAGGTIGCCCCTGCTGAGTTGGAATCG-3' (las mutaciones están subrayadas). Las mutaciones se introdujeron en primer lugar en pGL2 (Promega) en el que el lugar de reconocimiento diana está flanqueado casualmente por sitios de restricción *EcoRV* y *Clal* permitiendo la utilización de un conector pequeño para introducir las mutaciones. Para este propósito se hibridaron los oligonucleótidos 5'-ACCAGGTTGCCCTGCTGAGTTGGAAT-3' y 5'-CGATTCCAACCTCAGCAGGGGCAACCTGGT-3' y se trataron con quinasa. Este conector se enlazó a pGL2 digerida con *EcoRV* y *Clal*, en sustitución de la secuencia de destino sin modificar. A partir de este vector, se enlazaron las 765 pb del fragmento *SphI-SgrAI* que contiene la secuencia de luciferasa de luciérnaga con el sitio diana mutado al phAR-FF-RL sustituyendo la región *SphI-SgrAI* correspondiente. Tal como era de esperar, las mutaciones introducidas en el phAR-FF*-RL no influyeron en la actividad de la proteína luciferasa de luciérnaga, pero suprimieron el silenciamiento mediado por el ARNhc Ff1, tal como fue confirmado por la cotransfección del plásmido reportero mutado (phAR-FF*-RL) con pSHAG-Ff1. Se infectaron células A549 con Ad5-Δ24E3, Ad5-Δ24E3.U6-Ff1-R, o Ad5-Δ29E3.U6-Ff1-L, seguido de transfección con el plásmido reportero phAR-FF-RL o el plásmido reportero mutado phAR-FF*-RL. La figura 1C muestra que ambos CRAd de silenciamiento suprimieron la expresión de la luciferasa de luciérnaga 30 horas después de la infección, aproximadamente, el 50%, tal como anteriormente, pero no cambiaron la expresión de la luciferasa de luciérnaga mutante. Esto confirmó que el silenciamiento de la expresión observada de la luciferasa de luciérnaga era dependiente de la secuencia diana del ARNhc y se realiza a través de la ruta del ARNi de los mamíferos.

Ejemplo 7: Construcción de adenovirus de replicación condicional que silencian un antagonista de la p53.

Se realizó de la siguiente manera un derivado de Ad5- Δ 24E3 (Suzuki y otros, Clin. Cancer Res. 8 (2002): 3348-3359) que expresa un ARNhc dirigido contra VPH18-E6 impulsado por el promotor H1 PolIII. En primer lugar, se aisló ADNdc lineal de Ad5- Δ 24E3 de viriones y se recombinó con pEndK/SPE linealizado (*supra*) en bacterias BJ5183 para obtener el clon plasmídico pAd Δ 24E3, a partir del cual se libera ADN de Ad Δ 24E3 de longitud completa mediante digestión con Pacl. A continuación, se insertó un oligonucleótido sintético de doble cadena que comprende una secuencia de 19 nt a partir de VPH18 E6 (nucleótidos 385-403, numeración según Cole y Danos, J. Mol. Biol. 193 (1987): 599-608), seguido de un conector de bucle de 9 nt (letras minúsculas) y el complementario inverso de los 19 nt de la secuencia VPH18 E6, en el plásmido pSUPER (Brummelkamp y otros, Science 296 (2002): 550-553) para crear pSUPER-18E6. Con este fin, se hibridaron los oligonucleótidos FP_super18E6 (5'-gatccccCTAACACTGGGTTATACAAAtcaagagaTTGT ATAACCCAGTGTTAGtttttgaaa-3') y RP_super18E6 (5'-agcttttccaaaaCTAACACTGGGTTATACAAAtctcttgaATT GTATAACCCAGTGTTAGgGG-3') y se enlazaron e hibridaron en pSUPER digerido con BgIII/HindIII. A continuación, se digirió pSUPER-18E6 con HindIII, se rellenaron los extremos sobresalientes con polimerasa Klenow, y se relegaron para crear un sitio NheI. Posteriormente, se digirió con SpeI y NheI para liberar el fragmento H1_18E6, que se insertó a continuación en pEndK/SpeI digerido en SpeI, creando el plásmido pEndK.H1_18E6. El silenciamiento funcional de VPH-18 E6 que da como resultado una disminución de la inhibición de la actividad de p53 en células de cáncer humano transformadas por VPH-18 fue confirmado mediante la transfección de pEndK.B1_18E6 junto con el plásmido reportero específico de p53 PG13-Luc (el-Deiry y otros, Cell 75 (1993): 817-825) en células HeLa de carcinoma de cuello uterino y la medición de la expresión de la luciferasa. Esto reveló una actividad significativamente mayor de la luciferasa que la que se midió después de la transfección de control del pEndK/SpeI con PG13-luc o después de la transfección solamente de PG13-Luc. De este modo, el ARNhc expresado por pEndK.H1_18E6 silenció un antagonista de la p53. A continuación, pEndK.H1_18E6 se linealizó por digestión con KpnI y EcoRV y se recombinó con el ADN Ad5- Δ 24E3 linealizado con PAcl en células BJ5183 de E. coli. Esto creó pAd Δ 24.H1_18E6. Se transfectó pAd Δ 24.H1_18E6 linealizado con PAcl en células 911 (Fallaux y otros, Hum. Gene Ther. 7 (1996): 215-222) y se aisló el virus Ad Δ 24.H1_18E6 y se propagó posteriormente en células A549.

Se prepararon de la siguiente manera varios CRAd con la mutación Δ 24 en la región E1 (Fueyo y otros, Oncogene 19 (2000): 2-12) expresando cada uno un ARNhc diferente específico para los antagonistas de p53 quinasa-1 tipo polo (plk-1) y parc. Para ambos genes diana, se diseñaron tres construcciones de silenciamiento diferentes que se dirigen a diferentes secuencias del ARNm diana. Para cada construcción de silenciamiento, se sintetizó un conjunto de dos oligonucleótidos, las secuencias de los cuales se dan a continuación. Se permitió que estos oligonucleótidos se hibridaran y se insertaron en pSHAG-1 digerido con BseRI y BamHI según el ejemplo 2. Los casetes de expresión de ARNhc de las construcciones pSHAG-ARNhc resultantes se transfirieron a pAd Δ 24-DEST_R (ejemplo 1) mediante una reacción de recombinación *in vitro* LR GATEWAY según el ejemplo 3. Se digirieron los clones de longitud completa con Pacl y se transfectaron a células 911 para obtener el adenovirus competente en replicación que expresa ARNhc, que se propagó posteriormente en células A549.

Los conjuntos de oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: para plk-1; conjunto A: 5'-GGCGGCTTTGCCAAGTGCTTCTCGAGAAGCACTTGGCAAAGCCGCCCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGGGCGGCTTTGCCAAGTGCTTCTCGAGAAGCACTTGGCAAAGCCGCCCG-3'; conjunto B: 5'-GCCGCTCCCTCATCCAGAAGTCTGAGTTCTGGATGAGGGAGGCGGCCCTTTTT-3' y 5'-ATGAAGAAGGCGCCCTCCCTCATCCAGAAGTCTGAGTTCTGGATGAGGGAGGCGGCCG-3'; y conjunto C: 5'-ATGAAGAAGATCACCTCCTTACTCGAGTAAGGAGGGTGATCTTCTTCATCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGATGAAGAAGATCACCTCCTTACTCGAGTAAGGAGGGTGATCTTCTTCATCG-3'; y para parc; conjunto A: 5'-GAAGCTTTCCTCGAGATCCACTTCTGTCATGGATCTCGAGGAAAGCTTCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGGAAGCTTTCCTCGAGATCCATGACAGGAAGTGGATCTCGAGGAAAGCTTCCG-3'; conjunto B: 5'-GCATCGAGCAGCATGGATCTTCTGTCAAATCCATGTGCTGCTCGATGCCCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGGCATCGAGCAGCATGGATTGACAGGAAGATCCATGTGCTGCTCGATGCCG-3'; y conjunto C: 5'-CTCGCCAGGAGAAGCGGTTTCTTCTGTCAAACCGCTTCTCCTGGCGAGCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGCTCGCCAGGAGAAGCGGTTTTGACAGGAAGAAACCGCTTCTCCTGGCGAGCG-3'.

Ejemplo 8. Construcción de un adenovirus de replicación condicional que silencia un antagonista de p53 y expresa además un factor funcional de la ruta de apoptosis dependiente de p53.

Un derivado de Ad5- Δ 24E3 (Suzuki y otros, Clin. Cancer Res. 8 (2002): 3348-3359) que expresa un ARNhc dirigido contra VPH18-E6 impulsado por el promotor H1 PolIII y, además, que expresa p53 humana se preparó de la siguiente manera. En primer lugar, se realizó el plásmido pEndK/p53. Con este fin, se preparó un derivado de pBluescript SK(-) (Stratagene, La Jolla, California) que carece de sitio EcoRV mediante la digestión de pBluescript SK(-) con SmaI y EcoRV seguido de autoenlace. Este vector se digirió con KpnI y Sall y se insertó el fragmento de KpnI/Sall que contiene el casete de expresión de p53 humana impulsado por el promotor SV40 a partir de pABS.4-p53 (Van Beusechem y otros, Cancer Res. 62 (2002): 6165-6171) para crear pBSK-p53. Posteriormente, el sitio KpnI en pBSK-p53 se transformó en un sitio SpeI. Esto se hizo mediante la digestión pBSK-p53 con KpnI y la

inserción de un oligonucleótido sintético de doble cadena preparado mediante la hibridación del oligo 5'-TCAGGACTAGTGGAATGTAC-3' y el oligo 5'-ATTCCACTAGTCCTGAGTAC-3'. A continuación, el fragmento SV40-p53 de 2,6 kb se liberó por digestión con SpeI y se insertó en pEndK/Spe digerido en SpeI (*supra*). Se aisló un clon con una inserción en una orientación que coloca el casete SV40-p53 en la cadena L en el adenovirus y se designó como pEndK/p53. La expresión de p53 funcional a partir de pEndK/p53 se confirmó mediante la transfección de pEndK/p53 o la construcción de control pEndK/SpeI junto con plásmido reportero específico de p53 PG13-Luc o con el plásmido de control negativo MG15-Luc (el-Deiry y otros, Cell 75 (1993): 817-825) en células de osteosarcoma SaOs-2 sin p53 y la medición de la expresión de la luciferasa al día siguiente. La transfección de pEndK/p53 dio como resultado una proporción específica de p53 PG-13/MG-15 de 63, mientras que la proporción PG-13/MG-15 después de la transfección del vector pEndK/SpeI vacío fue sólo de 0,7. A continuación, pEndK/p53 se digirió con ClaI y se rellenó con polimerasa Klenow después de lo cual se insertó el fragmento HincII/SmaI que contiene el fragmento H1-18E6 a partir de pSUPER-18E6 (*supra*), creando pEndK/p53.H1_18E6. Por último, se linealizó el pEndK/p53.H1_18E6 por digestión con KpnI y EcoRV y se recombinó con ADN de Ad5- Δ 24E3 linealizado con PacI (*supra*) en células BJ5183 de E. coli para crear pAd Δ 24.p53(L).H1_18E6. Este vector se linealizó con PacI y se transfirió en células 911 de empaquetado. El virus pAd Δ 24.p53(L).H1_18E6 se aisló y se propagó posteriormente en células A549.

Ejemplo 9. Construcción de un adenovirus de replicación condicional que silencia un inhibidor de la ruta de p53.

Se realizaron CRAd con la mutación Δ 24 en la región E1 (Fueyo y otros, Oncogene 19 (2000): 2-12) y expresando cada uno un ARNhc específico diferente para bcl-2 utilizando el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 7 para hacer CRAd con ARNhc para plk-1 o parc. Sólo se utilizaron diferentes conjuntos de oligonucleótidos, específicos para las secuencias diana del ARNm de Bcl-2, es decir, conjunto A: 5'-CTGCACCTGACGCCCTTCACCTTCCTGTACAGTGAAGGGCGTCAGGTGCAGCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGCTGCACCTGACGCCCTTCACTGACAGGAAGGTGAAGGGCGTCAGGTGCAGCG-3'; conjunto B: 5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTTCTTCTGTCAAAAAGAAGGCCACAATCCTCCCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTTGCAGGAAGAAAGAAGGCCACAATCCTCCCG-3'; y conjunto C: 5'-GATCCAGGATAACGGAGGCTTCTTCTGTCAAGCCTCCGTTATCCTGGATCCTTTTT-3' y 5'-GATCAAAAAGGATCCAGGATAACGGAGGCTTGACAGGAAGAGCCTCCGTTATCCTGGATCCG-3'

Ejemplo 10. Construcción de un adenovirus de replicación condicional que silencia un antagonista de p53 y que tiene un tropismo cambiado.

Se preparó de la siguiente manera un derivado de Ad5- Δ 24RGD (Suzuki y otros, Clin. Cancer Res. 7 (2001): 120-126) que expresa un ARNhc dirigido contra VPH18-E6 impulsado por el promotor H1 PolIII y con un gen de fibra modificado que expande el tropismo del adenovirus causando una mayor infectividad y una potencia oncolítica mejorada en muchas células cancerosas humanas. Se aísla ADN de Ad5- Δ 24RGD lineal de longitud completa de doble cadena a partir de virus Ad5- Δ 24RGD utilizando un método conocido en la técnica y este ADN se recombina con pEndK.H1_18E6 digerido con KpnI/EcoRV (*supra*) en células BJ5183 de E. coli para crear pAd Δ 24RGD.H1_18E6. Posteriormente, se transfecta pAd Δ 24RGD.H1_18E6 linealizado con PacI a células 911 de empaquetado y se aísla el virus pAd Δ 24RGD.H1_18E6 y se propaga posteriormente en células A549.

Ejemplo 11. Construcción del adenovirus competente en replicación Ad5 Δ 24-SA-Luc, que expresa la luciferasa de luciérnaga dirigida por el MLP y que es útil para los métodos de identificación de un factor inhibidor de adenovirus y para seleccionar moléculas de ARNhc capaces de silenciar dicho factor inhibidor de adenovirus.

Para la construcción de adenovirus competentes en replicación con un transgén dirigido por el MLP de adenovirus endógeno, se inserta una secuencia aceptora de corte y empalme seguida de un sitio de clonación múltiple y un sitio de poliadenilación en lugar de la región E3 de un plásmido que contiene un genoma parcial de Ad5. Con este fin, se permitió que los oligonucleótidos sintéticos 5'-GGCAGGCGCAATCTTCGCATTTCTTTTTCCAGGAATCTAGAGATATCGAGCTCAATAAAG-3' y 5'-AATTCTTTATTGAGCTCGATATCTCTAGATTCTGGAAAAAGAAATGCGAAGATTGCGCCTGCCTGA-3' se hibridaran y se clonaron en pABS.4 (Microbix Biosystems, Toronto, Canadá) digeridos con EcoRI y PstI. El plásmido pABS.4-SA-MCS resultante contiene una secuencia de 32 nucleótidos de longitud de serotipo 40 de adenovirus que abarca el sitio aceptor de corte y empalme del gen de fibra largo, un pequeño sitio de clonación múltiple que incluye los sitios de restricción para XbaI, EcoRV y SacI, y un sitio de poliadenilación y está diseñado flexiblemente para insertar un transgén a elección. Para la construcción de adenovirus competentes en replicación con un transgén dirigido por el MLP endógeno de adenovirus que se pueden medir por un método simple y cuantitativo, se insertó el gen de la luciferasa de luciérnaga en el MCS de pABS.4-SA-MCS. Con este fin, se obtuvo ADNc de luciferasa de luciérnaga por PCR utilizando el vector PSP-Luc+ (Promega) como plantilla de ADN y los oligonucleótidos 5'-GGGTCTAGAGCCACCATGGAAGACGCCAAAAAC-3' y 5'-CCCGAGCTCCTTACACGGCGATCTTTCCGC-3', que contienen sitios de XbaI y SacI sobresalientes como cebadores. El producto de PCR se digirió con XbaI y SacI y se enlazó al pABS.4-SA-MCS digerido con las mismas enzimas para producir pABS.4-SA-Luc. Este plásmido se digirió con PacI y se insertaron el fragmento que contiene SA-Luc y el gen de resistencia a la kanamicina en pBHG11 digerido con PacI (Microbix biosystems). Se aisló un clon con la inserción en una orientación que coloca a la SA-Luc

sobre la cadena R del adenovirus, y se eliminó el gen de resistencia a la kanamicina posteriormente por digestión con SwaI seguido de autoenlace, proporcionando pBHG11-SA-Luc.

5 Para la construcción de un adenovirus de control que contiene el promotor CMV en lugar de la SA, se liberó el promotor CMV humano a partir de pAdTrack (He y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998): 2509-2514) con NheI y BglII y se subclonó en pBluescript SK(-)(-) (Stratagene) digerido con SpeI y BamHI. Posteriormente, este plásmido se digirió con XbaI y PstI y el fragmento que contiene el promotor de CMV se enlazó a pABS.4.SA.MCS digerido con XbaI y PstI, sustituyendo de este modo el sitio aceptor de corte y empalme con el promotor de CMV. Este plásmido (pABS.4-CMV-MCS) se utilizó para construir pBHG11-CMV-Luc, de una forma similar a la que se utilizó para obtener pBHG11-SA-Luc (*supra*).

10 Se prepararon adenovirus de replicación condicional que expresan luciferasa bajo la regulación del MLP o CMV por recombinación homóloga en células 293 entre el derivado pXC1 (Microbix Biosystems) de pXC1-Δ24, que porta una delección de 24 pb correspondiente a los aminoácidos 122-129 en el dominio CR2 de E1A necesario para la unión a la proteína Rb (Fueyo y otros, Oncogene 19 (2000): 2-12), respectivamente con pBHG11-SA-Luc o pBHG11-CMV-Luc. De esta manera, se generaron CRAd Ad5Δ24-SA-Luc y Ad5Δ24-CMV-Luc.

Ejemplo 12. La expresión de luciferasa por el adenovirus competente en replicación Ad5Δ24-SA-Luc en células huésped depende de la replicación del adenovirus.

20 Para investigar la expresión transgénica en relación con la replicación de adenovirus, se infectaron células A549 sembradas en placas de 96 pozos con 20 PFU/célula de adenovirus recombinante que expresa luciferasa durante 2 horas a 37°C después de lo cual se sustituyó el medio de infección con un nuevo medio con o sin apigenina inhibidora del ciclo celular. Debido a que la replicación del adenovirus requiere la progresión del ciclo celular a través de la fase S, el tratamiento con apigenina inhibe la replicación del adenovirus. Esto se confirmó observando que 25 horas después de la infección con Ad5-Δ24E3 (*supra*), las células cultivadas en presencia de 75 micromolar de apigenina contenían de 1.000 a 10.000 veces menos genomas virales de Ad5-Δ24E3 tal como se determinó por PCR cuantitativa. La actividad de la luciferasa se midió en células infectadas con adenovirus que se cultivaron sin o con diferentes concentraciones de apigenina a las 32 horas después de la infección, utilizando el sistema de ensayo de quimioluminiscencia de luciferasa (Promega). La Figura 2 muestra los resultados obtenidos con Ad5-Δ24-SA-Luc y Ad5-Δ24-CMV-Luc (*supra*) y el virus de control Ad5-ΔE1-CMV-Luc deficiente en replicación. El Ad5-ΔE1-CMV-Luc ha suprimido las regiones E1 y E3 y un casete de expresión en la región E1 que comprende el promotor CMV obtenido a partir de pCEP4 (Invitrogen) y el gen de la luciferasa de pGL3-Basic (Promega) (Yamamoto y otros Mol. Ther. 3 (2001): 385-394), proporcionado generosamente por el Dr. M. Yamamoto, de la Universidad de Alabama en Birmingham, Alabama). La expresión de la luciferasa por el vector de adenovirus deficiente en replicación Ad5-ΔE1-CMV-Luc no se vio afectada por el tratamiento con apigenina, lo que confirma que la expresión transgénica, tal como se espera, no depende de la replicación de adenovirus. La expresión de la luciferasa por el vector de adenovirus competente en replicación Ad5Δ24-CMV-Luc se redujo, aproximadamente, 35 veces por el tratamiento con apigenina, mostrando que la expresión transgénica era parcialmente dependiente de la replicación del adenovirus. 30 La expresión de la luciferasa por el vector de adenovirus competente en replicación Ad5Δ24-SA-Luc se redujo, aproximadamente, 4,600 veces por el tratamiento con apigenina, mostrando que la expresión transgénica impulsada por MLP en este virus es fuertemente dependiente de la replicación de adenovirus. De este modo, el Ad5-Δ24-SA-Luc es una herramienta útil para su utilización en los métodos según la presente invención, en los que se compara la replicación de adenovirus en un primer tipo de células con la replicación de adenovirus en un segundo tipo de células. La actividad de luciferasa en células infectadas con Ad5Δ24-SA-Luc está directamente relacionada con la replicación de Ad5Δ24-SA-Luc en dichas células y se puede medir mediante ensayos simples (*infra*).

Ejemplo 13. Método para identificar un factor inhibidor de adenovirus y para seleccionar moléculas de ARNhc capaces de silenciar dicho factor inhibidor de adenovirus.

50 Los factores inhibidores de la replicación o lisis de adenovirus, así como los factores de silenciamiento capaces de reducir la expresión de estos factores inhibidores se pueden identificar por el silenciamiento de genes celulares en las células diana utilizando ARNi, infectando estas células con un virus competente en replicación y midiendo el efecto del silenciamiento en la replicación y/o lisis. Tal como se ha mencionado en los antecedentes de la presente invención, ya están disponibles a gran escala bibliotecas de factores de silenciamiento en forma de ARNpi sintéticos o de plásmidos que codifican ARNhc. Están implantados métodos para llevar a cabo la transfección a gran escala de los miembros individuales de la bibliotecas (Berns y otros, Nature 428 (2004): 431-437; Paddison y otros, Nature 428 (2004): 427-431), que se pueden combinar fácilmente con la infección por un virus competente en replicación según los métodos conocidos en la técnica. Para la identificación exitosa de los factores inhibidores y los factores de silenciamiento utilizando estas librerías, es preferente utilizar un ensayo robusto y cuantitativo para medir de la replicación del virus y/o la lisis celular, que preferentemente debe ser compatible con una plataforma robótica para automatizar el proceso de cribado. Para medir la replicación adenoviral los presentes inventores han desarrollado el virus Ad5Δ24-SA-Luc competente en replicación que expresa el gen marcador luciferasa regulado por el promotor mayor tardío (véase el ejemplo 12). Dado que la expresión de la luciferasa del genoma de este virus depende de la replicación viral, la expresión de la luciferasa en células infectadas con este virus puede ser utilizada como un 65

marcador sensible de la replicación viral. Para medir la lisis de las células infectadas por el virus, ya están disponibles comercialmente ensayos colorimétricos, fluorimétricos y de quimioluminiscencia para la cuantificación de la muerte celular y la lisis celular, basados en la medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa liberada desde el citosol de las células dañadas al sobrenadante (Roche Applied Science; Cambrex; Promega).

Ejemplo 14. Un adenovirus de replicación condicional según el ejemplo 8 restaura las funciones de la p53 en células que expresan un factor de inhibición de adenovirus que es un antagonista de p53 y supera la replicación de adenovirus y/o la lisis retrasadas debido a la expresión de dicho factor de inhibición de adenovirus en las células huésped.

Se utilizaron los CRAAd Ad Δ 24 y Ad Δ 24-p53 (Van Beusechem y otros, Cancer Res. 62 (2002): 6165-6171) y Ad Δ 24.p53(L).H1_18E6 (véase el ejemplo 8) para infectar células HeLa de cáncer cervical VPH-18 positivas (obtenidas de ATCC) con 10 PFU/célula, 24 horas después las células HeLa se habían transfectado con 200 ng de plásmido PG13-Luc (el-Deiry y otros, Cell 75 (1993): 817-825) utilizando LipofectAMINE Plus (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. El PG13-Luc expresa el gen de luciferasa de luciérnaga impulsado por un promotor dependiente de p53. Setenta y dos horas después de la infección, las células se lisaron en Reporter Lysis Buffer (Promega) y se midió la quimioluminiscencia utilizando el Sistema de Ensayo Quimioluminiscente de Luciferasa (Promega) y un luminómetro Lumat LB 9507. Las unidades de luz relativas medidas se normalizaron en base a controles de infección simulados. Tal como puede observarse en la figura 3, la expresión funcional de la p53 sólo se elevó marginalmente en células infectadas con Ad Δ 24-p53 en comparación con células infectadas con Ad Δ 24, mostrando que la p53 se inhibió de forma eficaz por la proteína de VPH-18 E6 en células HeLa. En las células infectadas con Ad Δ 24.p53(L).H1_18E6, se midió un nivel significativamente superior de actividad de p53, mostrando que el ARNhc específico de VPH-18E6 en Ad Δ 24.p53(L).H1_18E6 había suprimido la inhibición de p53 en las células HeLa.

Para investigar si el silenciamiento de VPH-18E6 por Ad Δ 24.p53(L).H1_18E6 conduciría a un aumento específico de la replicación y/o la lisis del adenovirus en células cancerosas VPH-18 positivas, se utilizaron Ad Δ 24, Ad Δ 24-p53 y Ad Δ 29.p53(L).H1_18E6 para infectar células de HeLa o células SiHa de cáncer cervical VPH-16 positivas (obtenidas del ATCC). Dado que el ARNhc H1_18E6 es específico de VPH-18E6 y, de este modo, no inhibe VPH-16E6, las células SiHa sirvieron como controles negativos. Previamente, los presentes inventores habían descubierto que el aumento de eficacia de la expresión de p53 en algunas líneas celulares cancerosas excede las 100 veces (Van Beusechem y otros, Cancer Res. 62 (2002): 6165-6171). Una de estas líneas celulares, la línea de cáncer de pecho MDA-MB-231, se incluyó como control positivo. Se cultivaron células 5E4 por pocillo en placas de 24 pocillos y se realizó la infección el día siguiente a dosis víricas que oscilaron de 5 a 5E5 virus infecciosos por pocillo. Después de una hora, se reemplazó el medio y las células se cultivaron posteriormente durante 20 días con cambios del 50% del medio cada 3-4 días. Durante el cultivo, se permitió a los adenovirus competentes en replicación lisar las células huésped, liberando su progenie, que puede infectar nuevas células huésped. Cuanto más eficazmente se desarrolla el ciclo de vida vírico (replicación, lisis celular y reinfección), menos inoculación inicial de virus es necesaria para erradicar las células en el cultivo. Después de 20 días, el medio de cultivo se eliminó y las células adherentes que permanecen se fijaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en formaldehído al 4% (v/v) en PBS, y se tiñeron utilizando 10 g/l de colorante cristal violeta al 70% (v/v) en etanol durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados con agua, las placas de cultivo se secaron con aire y se escanearon con un densitómetro de imagen Bio-Rad GS-690. La figura 4 muestra que Ad Δ 24-p53 fue aproximadamente 1000 veces, 10 veces y menos de 10 veces más eficaz contra MDA-MB-231, células SiHa y células HeLa, respectivamente, que el Ad Δ 24. De este modo, la expresión de p53 aumentó la replicación lítica de adenovirus en células de cáncer cervical VPH positivas, pero ni de lejos tan profundamente como en células de cáncer VPH negativas. De forma importante, Ad Δ 24.p53(L).H1_18E6 fue aproximadamente 10 veces más eficaz contra células HeLa VPH18 positivas que Ad Δ 24-p53, pero de una efectividad similar al Ad Δ 24-p53 contra células MDA-MB-231 VPH negativas y células SiHa VPH18 negativas. Esto demostró que la expresión de un factor de silenciamiento de ARN de horquilla corta direccionado contra un factor inhibidor de adenovirus (VPH18E6) mitiga específicamente la replicación retrasada de adenovirus y/o la lisis en células huésped que expresan dicho factor inhibidor de adenovirus.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> vereniging voor christelijk wetenschappelijk onderzoek

<120> Virus competentes en replicación capaces de silenciar la expresión de un factor inhibidor de virus

<130> P27279PC00

<150> EP04076154.6 <151> 2004-04-15

<160> 37

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 1

gaggtcgacg cgatcgataa gcttgatc 30

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 2

tagaactagt cgatcgcccg ggctgcag 28

<210> 3

<211> 72

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 3

gattccaatt cagcgggagc cacctgatga agcttgatcg ggtggctctc gctgagttgg 60

aatccatttt tt 72

ES 2 375 061 T3

<210> 4
<211> 78
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 4

gatcaaaaaa tggattccaa ctcagcgaga gccacccgat caagcttcat caggtggctc 60
ccgctgaatt ggaatccg 78

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 5
ccagaagagc tcgcaacgtg gcatctgcta 30

<210> 6
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 6
gtttgagag ctctgggca caatgagc 29

<210> 7
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 7
acaacggtag cgaactaag ctgcag 26

<210> 8
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 8
ccgaaaggta ccacctgat ccttatc 27

<210> 9
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 9
accaggtgc ccctgctgag ttggaatcg 29

<210> 10
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 10

ES 2 375 061 T3

accaggtgc cctgctgag ttggaat 27

<210> 11
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 11
cgattccaac tcagcagggg caacctggt 29

<210> 12
<211> 64
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 12

gatcccccta acactgggtt atacaattca agagattgta taaccagtg ttagtttttg 60
gaaa 64

<210> 13
<211> 64
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 13

agcttttcca aaaactaaca ctgggttata caatctcttg aattgtataa cccagtgta 60
gggg 64

<210> 14
<211> 52
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 14
ggcggcttg ccaagtgct ctcgagaagc acttgcaaa gccgccctt tt 52

<210> 15
<211> 58
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 15
gatcaaaaag ggcggcttg ccaagtgct ctcgagaagc acttgcaaa gccgcccg 58

<210> 16
<211> 52
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 16
gccgcctccc tcatccagaa ctcgagttct ggatgagga ggcggcctt tt 52

ES 2 375 061 T3

<210> 17
<211> 58
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 17
gatcaaaaag gccgcctccc tcatccagaa ctcgagttct ggatgagggga ggcggccg 58

<210> 18
<211> 56
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 18
atgaagaaga tcaccctct tactcgagta aggaggggta tcttctcat ctttt 56

<210> 19
<211> 62
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 19

gatcaaaaag atgaagaaga tcaccctct tactcgagta aggaggggta tcttctcat 60
cg 62

<210> 20
<211> 56
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 20
gaagcttcc tcgagatcca cttcctgtca tggatctcga ggaaagcttc ctttt 56

<210> 21
<211> 62
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 21

gatcaaaaag gaagcttcc tcgagatcca tgacaggaag tggatctcga ggaaagcttc 60
cg 62

<210> 22
<211> 56
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 22
gcatcgagca gcacatggat cttcctgtca atccatgtgc tgctcgatgc ctttt 56

<210> 23
<211> 62
<212> ADN

<213> Artificial

<400>

gatcaaaaag gcatcgagca gcacatggat tgacaggaag atccatgtgc tgctcgatgc 60
cg 62

<210> 24

<211> 56

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 24

ctcgccagga gaagcggttt cttcctgtca aaaccgcttc tctggcgag ctttt 56

<210> 25

<211> 62

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 25

gatcaaaaag ctcgccagga gaagcggttt tgacaggaag aaaçcgcttc tctggcgag 60
cg 62

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 26

tcaggactag tggaatgtac 20

<210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 27

attccactag tctgagtac 20

<210> 28

<211> 56

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 28

ctgcacctga cgccctcac cttcctgtca gtgaaggcg tcagggtcag ctttt 56

<210> 29

<211> 62

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 29

gatcaaaaag ctgcacctga cgcccttcac tgacaggaag gtgaagggcg tcaggtgcag 60
cg 62

<210> 30
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 30
 ggaggattgt ggccttcttt ctctctgtca aaagaaggcc acaatcctcc ctttt 56

<210> 31
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 31

gatcaaaaag ggaggattgt ggccttcttt tgacaggaag aaagaaggcc acaatcctcc 60
cg 62

<210> 32
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 32
 gatccaggat aacggaggct ctctctgtca agcctccggt atcctggatc ctttt 56

<210> 33
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 33

gatcaaaaag gatccaggat aacggaggct tgacaggaag agcctccggt atcctggatc 60
cg 62

<210> 34
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 34

ggcaggcgca atcttcgcat ttcttttttc caggaatcta gagatcga gctcaataaa 60
g 61

<210> 35

ES 2 375 061 T3

<211> 69
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 35

aattctttat tgagctcgat atctctagat tcctggaaaa aagaaatgcg aagattgcgc 60

ctgcctgca 69

<210> 36
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 36
gggtctagag ccaccatgga agacgccaaa aac 33

<210> 37
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 37
cccgagctcc ttacacggcg atctttccgc 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Adenovirus competente en replicación capaz de replicarse y tener capacidad lítica en células diana, comprendiendo el virus en el genoma del mismo, como mínimo, una secuencia de ADN que codifica una molécula de ARN de interferencia funcional en la reducción de la expresión de un gen diana que codifica un factor inhibidor de adenovirus en dicha células diana, unido operativamente a una o más secuencias de control de la expresión, funcionales en dichas células diana, en el que el factor inhibidor de adenovirus es un antagonista de p53.
- 10 2. Adenovirus competente en replicación, según la reivindicación 1, en el que la molécula de ARN de interferencia comprende un ARN de doble cadena.
- 15 3. Adenovirus competente en replicación, según la reivindicación 2, en el que la longitud de la doble cadena comprende, como mínimo, 19 nucleótidos y menos de 30 nucleótidos por cadena.
- 20 4. Adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha molécula de ARN de interferencia comprende un ARN horquilla.
- 25 5. Adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho adenovirus es un adenovirus humano.
- 30 6. Adenovirus competente en replicación, según la reivindicación 5, en el que el adenovirus es un adenovirus de replicación condicional.
- 35 7. Adenovirus competente en replicación, según la reivindicación 6, en el que el adenovirus porta una mutación en la región E1A que abarca, como mínimo, una parte del dominio CR2 de E1A, preferentemente una delección que abarca los aminoácidos 122 a 129 (LTCHEAGF) de E1A.
- 40 8. Adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el genoma del virus comprende adicionalmente la secuencia de codificación, como mínimo, de p53 funcional en la restauración de la ruta de apoptosis dependiente de p53 en dichas células diana, unida operativamente a una o más secuencias de control de la expresión, funcionales en dichas células diana.
- 45 9. Adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el factor inhibidor de adenovirus se selecciona del grupo que comprende MDM2, Pirh2, COP1, Bruce, VPH-E6, virus del herpes-8 LANA, Parc, Mortalina, Plk-1 y p73DeltaN.
- 50 10. Adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que las células diana son células humanas, seleccionadas preferentemente del grupo que comprende células cancerosas, células artríticas o células vasculares del músculo liso.
- 55 11. Utilización de un adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en un medicamento.
- 60 12. Utilización, según la reivindicación 11, para la fabricación de un medicamento para suprimir el crecimiento celular descontrolado, en particular el crecimiento de células malignas.
- 65 13. Método para lisar células diana que expresan un factor inhibidor de adenovirus, que comprende las etapas de:
 - infectar dichas células diana *in vitro* con un adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que tiene capacidad lítica en dichas células diana,
 - replicar dicho adenovirus dentro de dichas células diana, comprendiendo adicionalmente la etapa de proporcionar, en el genoma del adenovirus, como mínimo, una secuencia de ADN que codifica un factor de silenciamiento, funcional en reducir la expresión de dicho factor inhibidor de adenovirus en dichas células diana, siendo dicha, como mínimo, una secuencia de ADN capaz de expresarse en las células diana tras la infección de las mismas por dicho adenovirus, en el que dicho factor inhibidor de adenovirus es un antagonista de la p53.
- 70 14. Método, según la reivindicación 13, que comprende adicionalmente la etapa de someter dichas células diana a irradiación, a un compuesto químico tóxico, a una molécula que inhibe una interacción proteína-proteína o que inhibe una ruta de señalización, a una proteína, entre las que se incluyen sin que constituyan limitación, un anticuerpo, una proteína proapoptótica, una proteína antiangiogénica, y una proteína fusogénica de membrana, o de introducir un gen que codifica dicha proteína que está unido operativamente a una o más secuencias de control de la expresión funcionales en dichas células diana.
- 75 15. Utilización de un adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para lisar dichas células diana después de la infección de dichos virus en dichas células diana y la replicación de los mismos.

16. Adenovirus competente en replicación, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su utilización en el tratamiento del cuerpo de un individuo que padece una enfermedad seleccionada del grupo que comprende cáncer, artritis, en particular artritis reumatoide, e hiperplasia celular del músculo liso vascular.

5

Figura 1 A

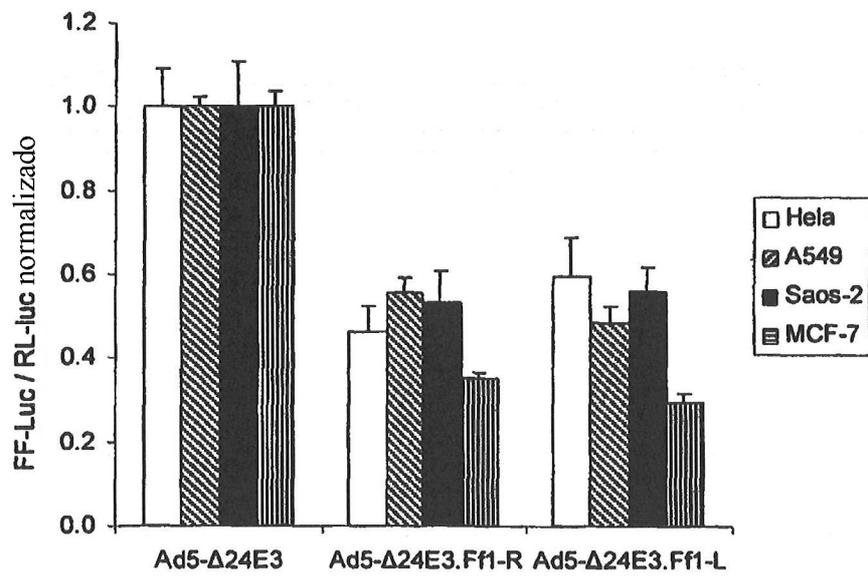


Figura 1 B

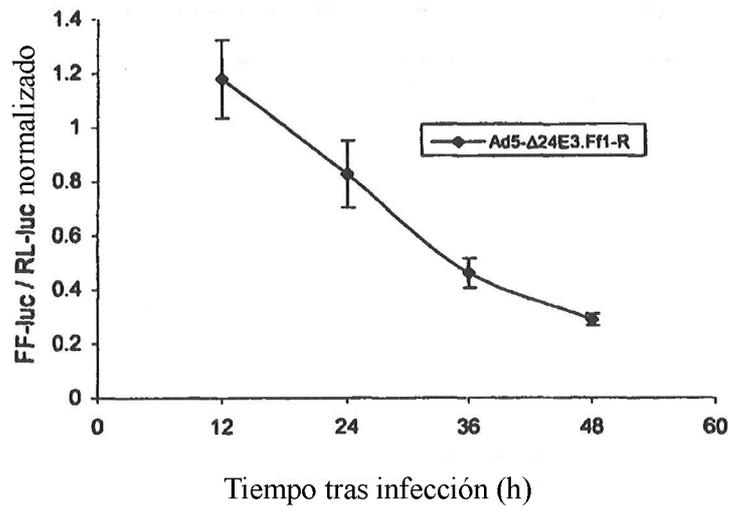


Figura 1 C

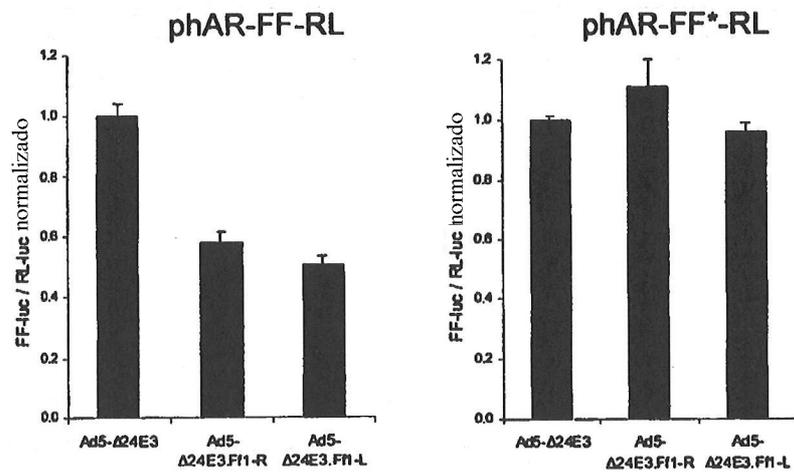


Figura 2

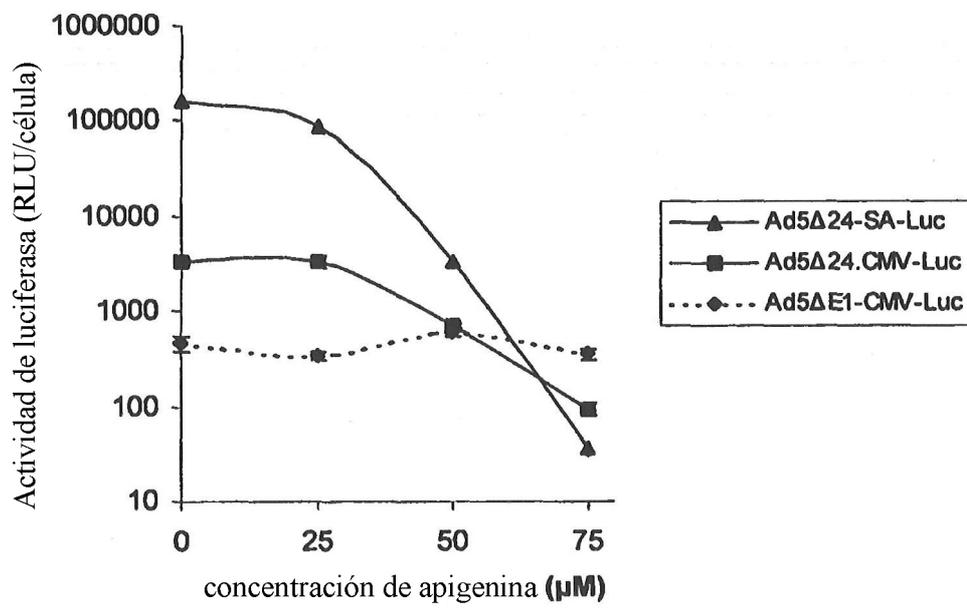


Figura 3

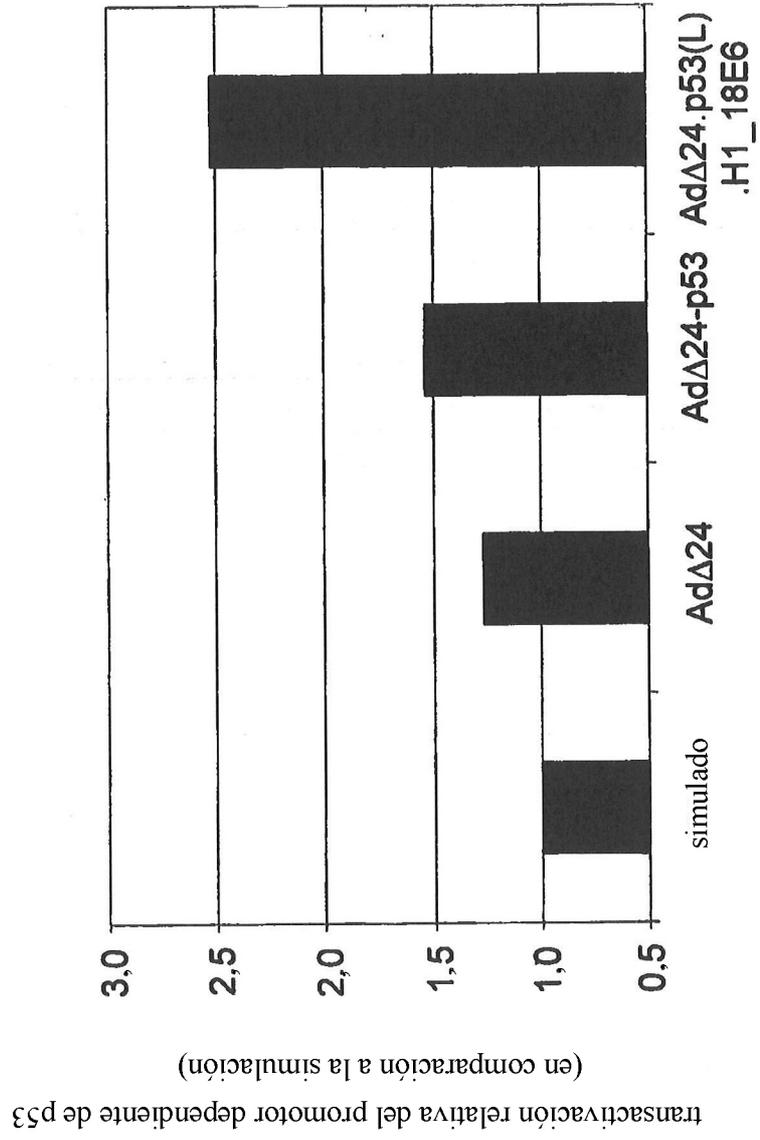


Figura 4

