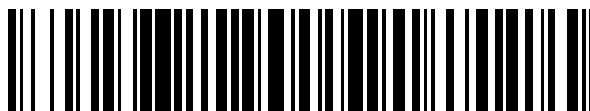


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 251**

21 Número de solicitud: 200901201

51 Int. Cl.:
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **06.05.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **20.07.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
20.07.2012

71 Solicitante/s:
**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA DE BELLVITGE
Av. Gran Via Hospitalet, 199
08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES y
INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA**

72 Inventor/es:
**GUEDÁN CARRIÓ, SÒNIA;
CASCALLÓ PIQUERAS, MANEL MARÍA y
ALEMANY BONASTRE, RAMÓN**

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

54 Título: **ADENOVIRUS ONCOLÍTICOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.**

57 Resumen:

Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer. La invención se refiere a un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia que codifica una enzima hialuronidasa insertada en su genoma. Este adenovirus se distribuye más eficientemente por la masa tumoral y por consiguiente se aumenta el efecto oncolítico. Inyectando el adenovirus oncolítico de la invención endovenosamente se obtienen regresiones del volumen tumoral. Por lo tanto el adenovirus oncolítico de la presente invención es útil para el tratamiento del cáncer o de un estado pre-maligno del mismo.

ES 2 385 251 A1

DESCRIPCION

Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer

5 La invención está relacionada con el campo de la medicina, más particularmente con el campo de la oncología, y específicamente con la viroterapia.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 El tratamiento actual del cáncer se basa principalmente en la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía. Pese a una elevada tasa de curación para el cáncer en estadios tempranos, la mayoría de casos avanzados de cáncer son incurables porque no pueden ser extirpados quirúrgicamente o porque las dosis radio o quimioterapéuticas administradas se ven limitadas por su toxicidad en células normales. Para paliar esta situación se han desarrollado
15 estrategias biotecnológicas que buscan aumentar la potencia y selectividad de los tratamientos oncológicos. Entre ellas, la terapia génica y la viroterapia utilizan virus con propósitos terapéuticos contra el cáncer. En terapia génica el virus se modifica para impedir su replicación y para servir de vehículo o vector de material genético terapéutico. Por el contrario, la viroterapia utiliza
20 virus que se replican y propagan selectivamente en las células tumorales. En viroterapia la célula tumoral muere por el efecto citopático causado por la replicación del virus en su interior más que por el efecto de un gen terapéutico. La replicación preferencial en una célula tumoral se denomina oncotropismo y la lisis del tumor se denomina oncolisis. En un sentido
25 estricto, los virus que se replican selectivamente en tumores se denominan oncolíticos, aunque en un sentido más amplio la palabra oncolítico se puede aplicar a cualquier virus replicativo capaz de lisar células tumorales, aunque sin selectividad. En esta descripción el término oncolítico se utiliza en los dos
30 sentidos.

35 La viroterapia del cáncer es muy anterior a la terapia génica. Las primeras observaciones de curaciones de tumores con virus datan de principios del siglo pasado. Ya en 1912 De Pace obtuvo regresiones tumorales tras inocular el virus de la rabia en carcinomas cervicales. Desde entonces se han inyectado muchos tipos de virus en tumores para su tratamiento. Hay virus que presentan un oncotropismo natural como por ejemplo el parvovirus autónomo, el virus de la estomatitis vesicular y el reovirus. Otros virus se

pueden manipular genéticamente para que se repliquen selectivamente en tumores. Por ejemplo el Herpes Simplex virus (HSV) se ha hecho oncotrópico al eliminar el gen de la ribonucleótido reductasa, una actividad enzimática dispensable en células en proliferación activa como las células tumorales. Sin embargo, el adenovirus, por su baja patogenicidad y alta capacidad de infectar células tumorales ha sido el virus más utilizado tanto en viroterapia como en terapia génica del cáncer.

Se han identificado 51 serotipos de adenovirus humanos y clasificado en 6 grupos diferenciados del A al F.

El adenovirus humano tipo 5 (Ad5), que pertenece al grupo C, es un virus formado por una cápside proteica icosaédrica que encierra un ADN lineal de 36 kilobases. En adultos la infección con Ad5 suele ser asintomática y en niños causa un resfriado común y conjuntivitis. En general el Ad5 infecta células epiteliales, que en el curso de una infección natural son las células del epitelio bronquial. Entra en la célula por medio de la interacción de la fibra, proteína viral que se extiende a modo de antena desde los doce vértices de la cápside, con una proteína celular implicada en adhesión intercelular llamada Receptor de Coxsackie-Adenovirus (CAR). Cuando el ADN viral llega al interior del núcleo empieza ordenadamente la transcripción de los genes tempranos o "early" (E1 a E4) del virus. Los primeros genes virales que se expresan corresponden a los genes de la región temprana 1A (E1A). E1A se une a la proteína celular Rb para liberar E2F y activar así la transcripción de otros genes virales como E2, E3 y E4 y de los genes celulares que activan el ciclo celular. Por otro lado, E1B se une a p53 para activar el ciclo celular e impedir la apoptosis de la célula infectada. E2 codifica para proteínas de replicación del virus; E3 codifica proteínas que inhiben la respuesta inmune antiviral; E4 codifica para proteínas de transporte de ARN viral. La expresión de los genes tempranos conduce a la replicación del ADN viral, y una vez replicado éste, se activa el promotor tardío principal que conduce a la expresión de un transcrito de ARN mensajero que por corte y empalme diferencial genera todos los ARN que codifican para las proteínas estructurales que forman la cápside.

Hay dos aspectos importantes a considerar en relación al diseño de adenovirus oncolíticos: la selectividad y la potencia. Para conseguir

selectividad hacia la célula tumoral se han usado tres estrategias: la eliminación de funciones virales que son necesarias para la replicación en células normales, pero prescindibles en células tumorales; el control de los genes virales que inician la replicación por promotores selectivos de tumor; y la modificación de las proteínas de la cápside viral implicadas en la infección de la célula huésped. Con estas modificaciones genéticas se ha conseguido un nivel de selectividad considerable, con una capacidad replicativa en célula tumoral del orden de 10000 veces superior a la capacidad replicativa en la célula normal. Con respecto a la potencia oncolítica también se han descrito diversas modificaciones genéticas para aumentarla. Estas modificaciones incluyen: a) el aumento de la liberación viral, por ejemplo mediante la eliminación de E1B19K, la sobreexpresión de E3-11.6K (ADP), o la relocalización de la proteína E3/19K en la membrana plasmática; y b) la inserción de un gen terapéutico en el genoma del adenovirus oncolítico para generar un "adenovirus oncolítico armado". En este caso, el gen terapéutico debería mediar la muerte de las células cancerígenas no infectadas mediante la activación de un profármaco con efecto adyacente (es decir, que mata a las células vecinas no infectadas), la activación del sistema inmune contra el tumor, la inducción de la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, o la eliminación de la matriz extracelular, entre otros. En estos casos, la forma y el tiempo de expresión del gen terapéutico serán críticos en el resultado final de la aproximación terapéutica.

En la última década, se han administrado diferentes adenovirus oncolíticos a pacientes con tumores de cabeza y cuello, tumores de ovario, cáncer colorectal, cáncer pancreático y carcinoma hepatocelular, entre otros. El perfil de seguridad de estos adenovirus en los ensayos clínicos ha sido muy prometedor. Los efectos secundarios detectados, como algunos síntomas parecidos a la gripe y elevaciones transitorias de las transaminasas, fueron bien tolerados, incluso después de la administración sistémica de altas dosis de virus (cfr. D. Ko et al., "Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses", Oncogene 2005, vol. 24, pp. 7763-74; y T. Reid et al., "Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials", Cancer gene therapy 2002, vol. 9, pp. 979-86). Aunque la administración de los adenovirus recombinantes indujo una supresión parcial del crecimiento tumoral, no se detectó ninguna erradicación completa de los tumores y, después de un corto periodo de tiempo, los tumores volvieron a

crecer rápidamente. Estos resultados se debieron probablemente a que los adenovirus inyectados sólo se distribuyeron en una pequeña parte del tumor para alcanzar una respuesta antitumoral restringida, de manera que las células no infectadas con virus siguieron creciendo rápidamente. En un trabajo reciente, se observó que la replicación de adenovirus oncolíticos en tumores xenógrafos humanos persistía hasta los 100 días después de su administración sistémica, aunque esta replicación no se traducía en una erradicación completa del tumor (cfr. H. Sauthoff et al., "Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points", Human gene therapy 2003, vol. 14, pp. 425-33). Esta baja eficacia antitumoral se debe en parte a que el tejido conectivo y la matriz extracelular (ECM) presentes en la célula tumoral impiden la correcta distribución de los adenovirus recombinantes por el tumor.

Esta dificultad de los adenovirus oncolíticos de distribuirse eficientemente por la masa tumoral se ha descrito también para otros fármacos anticancerígenos como la doxorubicina, el taxol, la vincristina o el metotrexate. Son muchos los estudios que demuestran la implicación de la ECM en la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos (cfr. BP Toole et al., "Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells", Seminars in cancer biology 2008, vol. 18, pp. 244-50). Las células tumorales y las células del estroma producen y ensamblan una matriz de colágenos, proteoglicanos y otras moléculas que dificultan el transporte de macromoléculas por el interior del tumor. El ácido hialurónico (HA) es uno de los principales componentes de la EMC implicado en la resistencia de las células tumorales a los fármacos terapéuticos. El HA se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tejidos malignos, y en muchos casos los niveles de HA son un factor pronóstico de progresión tumoral. La interacción del HA con los receptores CD44 y RHAMM incrementa la supervivencia tumoral y la invasión. Además el HA puede promover las metástasis tumorales mediante la inducción de la adhesión y la migración celular, y la protección frente al sistema inmunológico.

Por otra parte, la inhibición de las interacciones entre el ácido hialurónico y las células tumorales revierte la resistencia a gran cantidad de fármacos. Diferentes trabajos han indicado que las hialuronidasas (enzimas encargados

de la degradación del HA) aumentan la actividad de diferentes quimioterapias en pacientes con melanoma, sarcoma de kaposi, cáncer de cabeza y cuello y metástasis hepáticas de colon. El mecanismo de acción de las hialuronidasas es aun desconocido, pero por lo general se atribuye a una disminución de las barreras de adhesión celular, una disminución de la presión intersticial y una mejora en la penetración del fármaco anticancerígeno en el tumor, más que a sus efectos inhibitorios de las vías de señalización relacionadas con la supervivencia celular.

Recientemente se ha descrito que la coadministración de hialuronidasa con un adenovirus oncolítico mediante inyección intratumoral, reduce la progresión tumoral (cfr. S. Ganesh et al., "Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models", Clin Cancer Res 2008, vol. 14, pp. 3933-41). En estos estudios los adenovirus oncolíticos se administran en cuatro inyecciones intratumorales y la hialuronidasa se administra intratumoralmente en días alternos durante todo el tratamiento. Esta pauta de administración es poco aplicable a pacientes debido a que la mayoría de los tumores son inaccesibles para ser administrados intratumoralmente. Tampoco los pacientes con enfermedad diseminada (metástasis) se podrían beneficiar del tratamiento propuesto por Ganesh y colaboradores.

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, existe todavía la necesidad de encontrar nuevas aproximaciones terapéuticas que sean eficaces en el tratamiento del cáncer.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que un adenovirus que se replica y que contiene en su genoma adenoviral el gen de la enzima hialuronidasa insertado, se distribuye más eficientemente por la masa tumoral. La expresión de la hialuronidasa por parte del adenovirus oncolítico resulta en una degradación del ácido hialurónico que forma parte de la matriz extracelular del tumor. La degradación del ácido hialurónico resulta en una disminución de la presión intersticial del tumor y una menor resistencia del tumor a la distribución del adenovirus, de manera que se mejora la distribución del virus célula-célula por la masa tumoral. Esta mejor

distribución se traduce en un aumento del efecto oncolítico. Los inventores han encontrado que inyectando el adenovirus oncolítico de la invención endovenosamente se obtienen regresiones del volumen tumoral. Por lo tanto el adenovirus oncolítico de la presente invención es útil para el tratamiento del cáncer. Además, la expresión del gen de la hialuronidasa no afecta a la replicación viral ni a la citotoxicidad del adenovirus oncolítico.

Como se ha comentado antes, se ha descrito que la coadministración intratumoral de un adenovirus oncolítico y la hialuronidasa soluble aumenta la eficacia antitumoral de un adenovirus oncolítico. Aún así, previamente a esta invención el gen de la hialuronidasa no ha sido incorporado en ningún adenovirus oncolítico para el tratamiento del cáncer.

Como se describe en los ejemplos, la administración in vivo intratumoral del adenovirus oncolítico de la invención mejora el efecto antitumoral respecto a un adenovirus control sin hialuronidasa insertada (ver FIG. 7). Pero cuando se inyecta el adenovirus oncolítico de la invención endovenosamente (ver FIG. 8) y, comparándolo con lo que se representa en la figura 2 del artículo de Ganesh et al. 2, se observa una supresión del crecimiento tumoral mucho mayor en el caso del adenovirus de la invención, por lo que el tratamiento de la invención es más efectivo. Los tumores de los ratones inyectados con el adenovirus oncolítico de la invención (ICOVIR17) muestran zonas necróticas muy extensas, zonas con células viables muy reducidas, y grandes y numerosos focos de replicación viral, en comparación con los tumores inyectados con el adenovirus control, ICOVIR15.

Además, con el adenovirus de la invención las dosis administradas son menores: en Ganesh et al. (supra) se administran cuatro inyecciones intratumorales de 1×10^{10} partículas virales, mientras que en la presente invención se administra una sola dosis endovenosa de 2×10^9 partículas virales. Esto significa una reducción en la dosis de 20 veces y la ventaja de que se trata de una única dosis. En su aproximación, Ganesh et al. administran la hialuronidasa intratumoralmente en días alternos durante todo el experimento. Además el adenovirus también es administrado intratumoralmente al inicio del tratamiento. Esta administración intratumoral de virus y hialuronidasa es difícilmente aplicable a la clínica debido a que la mayoría de tumores no son accesibles para una administración intratumoral.

Presumiblemente la coadministración de hialuronidasa soluble y adenovirus no se realizó por vía sistémica pues la probabilidad de que ambos componentes alcancen conjuntamente las células tumorales diseminadas en el organismo es baja.

5

La presente invención permite la expresión de la hialuronidasa en el sitio y en el momento que se produce la replicación viral. Esta expresión de hialuronidasa mejora la distribución del virus por la masa tumoral y aumenta su potencia antitumoral. Se consigue administrar dosis ajustadas, no tóxicas para el animal y con una gran eficacia en el tratamiento.

10

En la presente invención los adenovirus oncolíticos llegan a las células tumorales diana, una vez dentro se replican, se expresan las proteínas de la cápside y al mismo tiempo se expresa la hialuronidasa contenida en el genoma adenoviral. Esta hialuronidasa ha sido modificada para ser liberada al medio extracelular que envuelve las células. En el medio extracelular, la hialuronidasa destruye la matriz y ayuda a que los adenovirus que se han replicado puedan infectar las células tumorales vecinas.

15

Así, un aspecto de la invención se refiere a un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia que codifica una enzima hialuronidasa insertada en su genoma.

20

Tal y como se usa aquí, el término "adenovirus oncolítico" significa un adenovirus que es capaz de replicarse o que es competente en replicación en la célula tumoral. En esta descripción adenovirus oncolítico y adenovirus replicativo son sinónimos. Se diferencian de un adenovirus no replicativo porque este último es incapaz de replicarse en la célula diana. Los adenovirus no replicativos son los utilizados en terapia génica como portadores de genes a las células diana puesto que se busca expresar el gen terapéutico dentro de la célula intacta y no la lisis de la célula. En cambio, la acción terapéutica de los adenovirus oncolíticos se basa precisamente en la capacidad de replicarse y lisar la célula diana, y en particular la célula tumoral que se quiere eliminar.

30

35

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del adenovirus oncolítico, junto con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere al adenovirus oncolítico de la invención para su uso como medicamento.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al adenovirus oncolítico de la invención para el tratamiento de un cáncer o de un estado pre-maligno del mismo, en un mamífero incluyendo un humano

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del adenovirus oncolítico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o de un estado pre-maligno del mismo, en un mamífero incluyendo un humano. El tratamiento se basa en la replicación de estos adenovirus oncolíticos en tumores. Alternativamente, este aspecto de la invención se puede formular como un método para el tratamiento en un mamífero incluyendo el hombre, de un cáncer o de un estado pre-maligno del mismo, que comprende la administración a dicho mamífero, de una cantidad efectiva del adenovirus oncolítico.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un vector lanzadera que es capaz de recombinar con un genoma adenoviral, para la construcción del adenovirus oncolítico de la invención. Este vector comprende secuencias repetidas terminales invertidas adenovirales ("inverted terminal repeats", ITRs), una secuencia que promueve la expresión de la secuencia que codifica la enzima hialuronidasa, la secuencia que codifica la enzima y una secuencia de poliadenilación.

30 En una realización particular, el adenovirus oncolítico de la invención es un adenovirus humano, es decir que infecta humanos. Particularmente, el adenovirus humano se selecciona del grupo que consiste en los adenovirus humanos de serotipo 1-51 y derivados de los mismos. Se entiende por "derivado" un adenovirus recombinante híbrido de dos o más serotipos diferentes de adenovirus, p.ej. un adenovirus serotipo 5 con la fibra del adenovirus serotipo 3. En una realización particular de la invención, el adenovirus oncolítico humano es de serotipo 5.

Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan el ácido hialurónico. En el hombre existen 6 genes que codifican para hialuronidasas con propiedades y localizaciones diferentes. Las isoformas Hyal1 y Hyal2 se encuentran en la mayoría de tejidos, siendo Hyal1 la forma predominante en el plasma humano. La Hyal3 se localiza en medula ósea y en los testículos, pero su función no está bien caracterizada. La hialuronidasa PH20 se encuentra altamente expresada en los testículos y está implicada en el proceso de fertilización del oocito por parte del espermatozoide. La hialuronidasa PH20 se encuentra anclada en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides y confiere al espermatozoide la capacidad para penetrar a través de la matriz extracelular de las células del cumulus (rica en ácido hialurónico) para alcanzar la zona pelúcida del oocito. Durante la reacción acrosomal, parte de las hialuronidasas ancladas en la membrana del espermatozoide son procesadas enzimáticamente para dar lugar a una forma soluble de la proteína que es liberada de la membrana acrosomal. Además, la hialuronidasa se ha identificado como el factor de dispersión del veneno de serpientes, arañas, escorpiones y avispas.

En una realización particular, la enzima hialuronidasa es una hialuronidasa testicular de mamífero, y más particularmente, la hialuronidasa testicular humana. La hialuronidasa testicular humana (GenBank GeneID: 6677) también se conoce como SPAM1 o molécula de adhesión del espermatozoide 1 ("sperm adhesion molecule 1"), y PH-20. La proteína de membrana PH20, es la única enzima de la familia de las hialuronidasas de mamífero con actividad a pH neutro. El gen que la codifica produce dos variantes transcripcionales: la variante 1, más larga, que codifica por la isoforma 1 de la proteína (número de acceso al GenBank NP_003108.2) y la variante 2, que utiliza un splicing alternativo en la región codificante 3' comparado con la variante 1, que resulta en una isoforma 2 con un extremo C' terminal más corto (número de acceso al GenBank NP_694859.1).

En una realización particular de la invención, la secuencia de la enzima tiene eliminada la secuencia correspondiente al dominio carboxiterminal de unión a membrana para que la enzima sea soluble (ver FIG. 2). La eliminación de este dominio carboxiterminal resulta en la secreción de la hialuronidasa al

medio extracelular. Así, se ha obtenido un adenovirus oncolítico que expresa una hialuronidasa secretada con actividad enzimática a pH neutro. En una realización particular, la secuencia que se inserta en el genoma adenoviral es una que codifica la SEQ ID NO: 2. En una realización más particular, la
5 secuencia que se inserta es la SEQ ID NO: 1.

En otra realización, la secuencia de la enzima está insertada en el adenovirus oncolítico después de la secuencia de nucleótidos de la fibra adenoviral.

10 En otra realización particular, la expresión de la enzima está controlada por un promotor operativo en células animales. Particularmente, el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor del citomegalovirus, el promotor principal tardío del adenovirus, el promotor SV40, el promotor de la timidin quinasa del herpes simplex virus, el promotor RSV, el promotor EF1
15 alfa, el promotor de la beta-actina, el promotor de la IL-2 humana, el promotor de la IL-4 humana, el promotor de IFN, el promotor de E2F y el promotor humano GM-CSF. El promotor que regula la expresión de la enzima puede estar en el adenovirus de manera natural como es el caso del promotor principal tardío del adenovirus (ver FIG. 1 (a), MLP, "major late promotor"). El
20 promotor también puede insertarse junto con la secuencia que codifica la enzima. En una realización preferida, el promotor es el promotor principal tardío del adenovirus.

El adenovirus replicativo de la invención puede tener modificaciones en su
25 secuencia genómica que le confieran una replicación selectiva en células tumorales. En una realización particular esto se consigue con la incorporación de un promotor específico de tejido o un promotor específico de tumor, donde dicho promotor controla la expresión de uno o más genes del grupo E1a, E1b, E2 y E4. Particularmente el promotor se selecciona del grupo que
30 consiste en el promotor de E2F, el promotor de la telomerasa hTERT, el promotor de la tirosinasa, el promotor del antígeno específico de próstata (PSA), el promotor de la alfa-fetoproteína, el promotor de la COX-2, así como promotores artificiales formados por varios sitios de unión a factores de transcripción como sitios de unión para el factor inducible por hipoxia (HIF-1),
35 el factor de transcripción Ets, el factor citotóxico tumoral (tcf), el factor de transcripción E2F o el factor de transcripción Sp1. Preferiblemente el promotor controla la expresión de E1a.

Otra modificación para conseguir replicación selectiva en tumores es la eliminación de funciones tempranas de E1A que bloquean la vía de retinoblastoma (RB). Otros genes virales que interaccionan directamente con pRB como E4 y E4orf6/7 respectivamente, son candidatos a ser eliminados para conseguir replicación selectiva en células tumorales. Como se ilustra en los ejemplos, el adenovirus oncolítico ICOVIR17 se caracteriza por contener simultáneamente el gen de la hialuronidasa, la eliminación $\Delta 24$ que afecta a la interacción de E1a con pRB, la inserción de cuatro sitios de unión a E2F-1 y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1a para controlar la expresión de E1a, y finalmente, la inserción del péptido RGD en la fibra adenoviral para aumentar la infectividad del virus. El ICOVIR17 es una realización preferida de la invención.

Otra modificación descrita para conseguir replicación selectiva en tumores es la eliminación de los genes adenovirales que codifican los ARN asociados al virus (VA-RNAs). Estos RNAs bloquean la actividad antiviral del interferón y su eliminación resulta en adenovirus sensibles a ser inhibidos por interferón. Puesto que las células tumorales se caracterizan por truncar la vía de interferón dichos adenovirus se replican normalmente en tumores. Así, en otra realización particular, la replicación selectiva en tumores se consigue con mutaciones en uno o más genes del grupo E1a, E1b, E4 y VA-RNAs del adenovirus. Preferiblemente las mutaciones son en E1a.

Estas dos estrategias para conseguir la replicación selectiva en tumores no son excluyentes entre sí.

En otra realización de la invención, el adenovirus tiene modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral. En una realización más preferida las proteínas de la cápside adenoviral se han modificado genéticamente para incluir ligandos que aumentan la infectividad o que dirigen el virus a un receptor en la célula tumoral. Dirigir el adenovirus al tumor también se puede conseguir con ligandos bifuncionales que unen al virus por un lado y al receptor tumoral por otro. Por otro lado, para aumentar la persistencia del adenovirus en sangre y con ello aumentar las posibilidades de alcanzar nódulos tumorales

diseminados, la cápside puede cubrirse con polímeros como el polietilenglicol.

5 En otra realización particular, el adenovirus comprende una secuencia que optimiza la traducción proteica de la secuencia que codifica la hialuronidasa.

10 En otra realización particular, el adenovirus comprende una secuencia que promueve la expresión de la secuencia que codifica la hialuronidasa. Más particularmente, esta secuencia se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de corte y empalme que permite el procesamiento del RNA, una secuencia IRES ("internal ribosome entry site"), y la secuencia 2A de picornavirus.

15 En otra realización particular, el adenovirus oncolítico a su vez comprende otros genes insertados en su genoma usados comúnmente en el campo de terapia génica del cáncer para aumentar la citotoxicidad de los adenovirus oncolíticos sobre células tumorales. Algunos de ellos son el gen de la timidina quinasa, el de la citosina deaminasa, genes proapoptóticos, inmunoestimuladores, supresores tumorales o activadores de prodrogas.

20 Estas modificaciones en el genoma del adenovirus no son excluyentes entre ellas. Existen varios métodos para manipular el genoma adenoviral. Los métodos de construcción de adenovirus modificados genéticamente están bien establecidos en el campo de la terapia génica y la viroterapia con
25 adenovirus. El método más comúnmente utilizado se basa en construir primero la modificación genética deseada en un plásmido que contiene la región adenoviral a modificar, para después realizar una recombinación homóloga en bacterias con un plásmido que contiene el resto del genoma viral.

30 El adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa objeto de la presente invención se propaga y amplifica en líneas celulares normalmente utilizadas en el campo de la terapia génica y viroterapia como las líneas HEK-293 y A549. El método preferido de propagación es por infección de una línea
35 celular permisiva a la replicación del adenovirus. La línea de adenocarcinoma pulmonar A549 es un ejemplo de línea con tales características. La propagación se realiza por ejemplo del siguiente modo: Las células A549 se

crecen sobre placas de cultivo celular de plástico y se infectan usando 100 partículas virales por célula. Dos días después el efecto citopático que refleja la producción de virus se observa como un arracimamiento de las células. Las células se recogen y se almacenan en tubos. Después de una

5 centrifugación a 1000 g durante 5 minutos, el precipitado celular se congela y descongela tres veces para romper las células. El extracto celular resultante se centrifuga a 1000 g durante 5 minutos y el sobrenadante con virus se carga encima de un gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 1 hora a 35000 g. La banda de virus obtenida del gradiente se carga de nuevo

10 sobre otro gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 16 horas a 35000 g. La banda de virus se recoge y se dializa frente a PBS-10% glicerol. El virus dializado se alicuota y almacena a -80 °C. La cuantificación del número de partículas y unidades formadoras de placa se realiza siguiendo protocolos estándar. El tampón fosfato salino (PBS) con glicerol al 5% es una

15 formulación estándar para el almacenamiento de adenovirus. Sin embargo se han descrito nuevas formulaciones que mejoran la estabilidad del virus. Los métodos de purificación del adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa para su utilización en el tratamiento del cáncer son los mismos que los descritos para otros adenovirus y vectores adenovirales utilizados en

20 viroterapia y terapia génica del cáncer.

El adenovirus oncolítico de la presente invención puede ser administrado a un mamífero, preferiblemente un humano. El propósito de la administración del adenovirus oncolítico es terapéutico, incluyendo, pero no limitándose a,

25 melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de pulmón. También se contempla la administración del adenovirus oncolítico en estadios pre-malignos de un tumor.

Se entiende que el adenovirus oncolítico se administra en una forma

30 farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la materia pueden asegurarse de la dosis apropiada usando procedimientos estándares. Se entiende que la dosis debe ser una cantidad efectiva del adenovirus oncolítico para que produzca una reducción del tumor en el individuo tratado. La administración puede ser directa del virus al tumor, en la cavidad donde se localiza el tumor,

35 en la vascularura del tumor, alrededor del tumor, o por la inyección endovenosa sistémica en el paciente. Preferiblemente, la administración es sistémica.

Los protocolos para usar los virus descritos en la presente invención en el tratamiento del cáncer siguen los mismos procedimientos que los usados en los campos de viroterapia con adenovirus y terapia génica con adenovirus.

5 Existe una amplia experiencia en el uso de adenovirus no oncolíticos y oncolíticos en el campo de la terapia génica. Existen numerosas publicaciones de tratamiento de células tumorales en cultivo, en modelos animales y en ensayos clínicos con pacientes. Para el tratamiento de células en cultivos in vitro el adenovirus purificado en cualquiera de las formulaciones
10 descritas más arriba se añade al medio de cultivo para la infección de las células tumorales. Para tratar tumores en modelos animales o en pacientes humanos el adenovirus se puede administrar loco-regionalmente por inyección en el tumor o en una cavidad corporal donde se localiza el tumor, o bien sistémicamente por inyección en el torrente sanguíneo.

15 El adenovirus oncolítico de la invención puede administrarse solo o en una composición con transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. El experto en el tema adaptará la composición dependiendo del modo particular de administración. Las composiciones pueden comprender el
20 adenovirus oncolítico como único agente contra el tumor, o en combinación con otro agente terapéutico como un fármaco quimioterapéutico o un vector con un gen terapéutico insertado. También puede combinarse la terapia con el adenovirus oncolítico con radioterapia.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los comúnmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la
30 palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de
35 ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 (a) muestra la estructura de adenovirus oncolíticos caracterizados por contener y expresar el gen de la hialuronidasa PH20. El adenovirus AdwtRGD-PH20 contiene el gen de la proteína PH20 insertado detrás del gen de la fibra adenoviral. La expresión del gen de la proteína PH20 está regulada por el promotor principal tardío (MLP) del adenovirus mediante la inserción de la secuencia de corte y empalme IIIa del adenovirus (SA) delante del gen de la proteína PH20. La traducción proteica de dicho gen está optimizada gracias a la introducción de la secuencia kozac (K) justo antes de la secuencia de inicio de la traducción. Los adenovirus ICOVIR15 e ICOVIR17 son adenovirus de replicación selectiva en tumores. Se caracterizan por contener 4 sitios de unión a E2F y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1a. Además, ICOVIR17, contiene el gen de la hialuronidasa PH20 del mismo modo que el adenovirus salvaje AdwtRGD-PH20.

La FIG. 1 (b) muestra la secuencia incorporada en el adenovirus Ad Δ 24RGD sustituyendo su secuencia del nucleótido 419 al 422. Esta incorporación se realiza para insertar cuatro sitios de unión a los factores E2F-1 y un sitio de unión al factor Sp1. La secuencias subralladas como "nt 385-419" y "nt 422-461) corresponden a las salvajes de Ad Δ 24RGD.

La FIG. 1 (c) muestra el casete completo integrado en los genomas de ICOVIR17 y AdwtRGD-PH20 respecto a los genomas de ICOVIR15 y AdwtRGD (SEQ ID NO: 4). Se indica la secuencia aceptora de splicing IIIa, la secuencia Kozac y la secuencia de poliadenilación (pola). La secuencia codificante para la proteína PH20 va de la secuencia kozac a la secuencia de poliadenilación.

La FIG. 2 muestra la secuencia aminoacídica de la proteína PH20 (SEQ ID NO: 2) y representación gráfica hidropática según el algoritmo de Kyte-Doolittle. La proteína PH20 es una proteína de membrana presente en la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides. (a) La secuencia aminoacídica muestra la secuencia hidrofóbica responsable del anclaje de la proteína en la membrana (secuencia señalada con subrayado). En la presente invención, la proteína PH20 expresada por los virus, presenta una

cola hidrofóbica eliminada. El punto de corte se muestra dentro de un círculo. De ésta forma, la proteína PH20 es secretada al medio extracelular. (b) Representación gráfica hidropática de los últimos 100 aminoácidos de la proteína PH20 según Kyte-Doolittle. Con una flecha se indica el inicio de la
5 cola hidrofóbica que ha sido eliminada.

La FIG. 3 es una demostración de que los adenovirus oncolíticos que contienen el gen de la hialuronidasa PH20 expresan una proteína soluble que presenta actividad hialuronidasa. Para demostrar que la proteína PH20
10 expresada por los adenovirus oncolíticos es liberada al medio extracelular y presenta actividad hialuronidasa, las células A549 fueron infectadas con los adenovirus AdwtRGD, AdwtRGD-PH20, ICOVIR15 e ICOVIR17. Después de 48 horas, el sobrenadante se recogió, se concentró y se incubó toda la noche con una solución de ácido hialurónico. Los productos de degradación del
15 ácido hialurónico (oligosacáridos formados por un número variable de unidades de disacáridos) fueron analizados mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida. Los geles muestran como las muestras de ácido hialurónico incubadas con los sobrenadantes de los virus que expresan la hialuronidasa PH20 han sido digeridas dando lugar a oligosacaridos de
20 diferentes tamaños. Las muestras incubadas con los sobrenadantes de los adenovirus controles (AdwtRGD e ICOVIR15) presentan el ácido hialurónico sin digerir.

La FIG. 4 es una demostración de que la inserción y expresión del gen de la
25 hialuronidasa PH20 no interfiere en la replicación viral de un adenovirus de replicación selectiva de tumor. Se infectaron células de las líneas A549 (a) y SKMel28 (b) con los adenovirus oncolíticos ICOVIR15 e ICOVIR17 (que se diferencia de ICOVIR15 por contener el gen de la PH20) y se midió la cantidad de virus de los extractos celulares (virus total, eje de las x, en TU/ml)
30 a diferentes tiempos (eje de las y, en horas post-infección). Las gráficas muestran como las cinéticas de producción viral son idénticas para los dos virus, demostrando que la inserción y expresión del gen de la hialuronidasa PH20, en el adenovirus ICOVIR17, no afecta a la replicación viral.

35 La FIG. 5 muestra la eficacia oncolítica in vitro de un adenovirus oncolítico que contiene y expresa el gen de la hialuronidasa PH20. La capacidad oncolítica de un adenovirus que expresa la hialuronidasa PH20 (ICOVIR17)

se comparó con la de un virus oncolítico similar pero sin el gen de la hialuronidasa PH20 (ICOVIR15) en dos líneas tumorales que expresan gran cantidad de ácido hialurónico in vitro, las SKMel28 (a) y las PC3 (b). El efecto citopático (CPE) que el virus induce se mide como una disminución de la cantidad de proteína en una monocapa celular infectada (método BCA). Las

5 células se sembraron en placas de 96 pocillos a 10000 células por pocillo. Al día siguiente las células se infectaron con diluciones seriadas de virus. Las células infectadas se incubaron durante 5 días, se lavaron con PBS y se midió la cantidad de proteína restante en el pocillo. Los resultados muestran

10 que in vitro, la expresión de la hialuronidasa PH20 no mejora la capacidad oncolítica del adenovirus, siendo las curvas de citotoxicidad idénticas para los dos virus. Se representa el % de supervivencia celular vs. TU/células.

La FIG. 6 es una demostración in vivo de la capacidad antitumoral de un

15 adenovirus oncolítico que expresa la hialuronidasa PH20. Se inocularon células de melanoma humano (SKMel28) en cada flanco posterior de ratones atímicos de la cepa Balb/c. Una vez los tumores alcanzaron una media de 150 mm^3 , fueron inyectados con PBS o 1×10^8 unidades de transducción de AdwtRGD-PH20 (10 tumores/grupo). (a) La gráfica muestra la media del

20 crecimiento de los tumores (en %) de cada grupo respecto al día 0 en función del tiempo post-administración (en días). El resultado demuestra que un adenovirus oncolítico que expresa el gen de la hialuronidasa PH20 presenta una elevada capacidad antitumoral, significativamente distinta al grupo control (PBS), $p < 0.00001$. El 100% de los tumores inyectados con el

25 AdwtRGD-PH20 regresaron entre un 10-50 % a día 27 post-inyección, frente a un 0 % de regresión en el grupo inyectado con PBS. (b) La cantidad de ácido hialurónico de los tumores inyectados con PBS o AdwtRGD-PH20 fue analizado al final del experimento por inmunohistoquímica. Las fotografías muestran que los tumores inyectados con el AdwtRGD-PH20 presentan una

30 cantidad de ácido hialurónico inferior a los tumores controles.

La FIG. 7 muestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 mejora el efecto antitumoral de un adenovirus oncolítico después de su administración intratumoral. Se inocularon células de melanoma humano (SKMel28) en cada

35 flanco posterior de ratones atímicos de la cepa Balb/c. Una vez los tumores alcanzaron una media de 130 mm^3 , los tumores fueron inyectados con PBS o 1×10^8 unidades de transducción de ICOVIR15 e ICOVIR17 (10

tumores/grupo) en una única dosis. (a) La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores (en %) de cada grupo respecto al día 0 en función del tiempo post-administración (en días). El adenovirus oncolítico que expresa la hialuronidasa PH20 (ICOVIR17) presenta un mejor efecto antitumoral que el adenovirus control que no expresa dicha hialuronidasa (ICOVIR15). (b) Después de 42 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos y pesados. La tabla muestra un resumen de los valores de volumen tumoral, porcentaje de crecimiento tumoral y peso de los tumores al final del experimento. Los tumores inyectados con ICOVIR17 presentan un peso tumoral significativamente inferior a los tumores inyectados con ICOVIR15 (* $p < 0.05$) y a los tumores inyectados con PBS (# $p < 0.05$). A diferencia de los resultados obtenidos in vitro, donde los virus pueden difundir sin dificultad por la monocapa de células, los resultados in vivo demuestran que en el interior de un tumor, donde la matriz extracelular dificulta la correcta distribución del virus, la expresión de la hialuronidasa PH20 incrementa la potencia antitumoral de un adenovirus oncolítico.

La FIG. 8 muestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 mejora el efecto antitumoral de un adenovirus oncolítico después de su administración sistémica. Se inocularon células de melanoma humano (SKMel28) en cada flanco posterior de ratones atímicos de la cepa Balb/c. Una vez los tumores alcanzaron una media de 100 mm^3 , los ratones fueron inyectados con PBS ó 5×10^{10} partículas físicas de ICOVIR15 e ICOVIR17 (ICOVIR15 armado con PH20)(8-10 tumores/grupo) por vía endovenosa. (a) La gráfica muestra la media del crecimiento de los tumores (en %) de cada grupo respecto al día 0 en función del tiempo post-administración (en días). El resultado demuestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 resulta en un aumento de la potencia oncolítica del adenovirus, siendo la supresión del crecimiento tumoral inducida por ICOVIR17 significativamente mejor a la del grupo control (ICOVIR15), * $p < 0.00001$. (b) Las fotografías muestran la distribución de los adenovirus ICOVIR15 e ICOVIR17 por las masas tumorales, extraídas al final del experimento (día 48). Los tumores de los ratones inyectados con el adenovirus oncolítico ICOVIR17 muestran zonas necróticas muy extensas (flecha gruesa), zonas con células viables muy reducidas (v), y grandes y numerosos focos de replicación viral (zonas con fluorescencia verde

indicadas con flechas delgadas) en comparación con los tumores inyectados con el adenovirus control, ICOVIR15.

EJEMPLOS

5

Construcción de los adenovirus oncolíticos

Se construyeron dos adenovirus oncolíticos que contenían el gen de la hialuronidasa PH20, el adenovirus AdwtRGD-PH20 y el adenovirus
10 ICOVIR17.

El cDNA de la hialuronidasa PH20 se obtuvo mediante la amplificación por PCR de los diferentes exones de la proteína a partir del genoma de la línea celular A549 y la posterior unión de estos exones con oligonucleótidos
15 específicos que contienen la diana del enzima de restricción MfeI. El fragmento resultante se digirió con MfeI y se clonó por ligación en el plásmido lanzadera, pNKFiberRGD (que contiene la secuencia de la fibra adenoviral modificada con RGD), para dar lugar al plásmido pNKFiberPH20. El cDNA correspondiente a la proteína PH20 clonada en el plásmido pNKFiberPH20
20 se muestra en la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 muestra los nucleótidos codificantes para la proteína PH20 (isoforma con número de acceso al GenBank NP_694859.1) desde su inicio de transcripción (ATG) hasta la posición 1467. La secuencia nucleotídica de la región 1468 a la 1527 codifica para la cola hidrofóbica de la proteína, responsable de su anclaje a la
25 membrana. Dicha secuencia ha sido eliminada y no se muestra en la secuencia. Después del nucleótido 1468 se ha añadido el codón de parada de la traducción TAA.

Construcción del adenovirus AdwtRGD-PH20: Para generar el adenovirus
30 AdwtRGD-PH20, el gen de la fibra adenoviral del plásmido pVK50cau (que contiene la secuencia completa del Ad5 con una diana SwaI en la fibra) fue reemplazado por recombinación homóloga en levaduras por el gen de la fibra seguido del gen de la hialuronidasa PH20 del plásmido pNKFiberPH20 digerido con NotI/KpnI.

35

El adenovirus AdwtRGD-PH20, caracterizado por expresar el gen de la hialuronidasa PH20 bajo el control del promotor principal tardío, y contener el

tripéptido RGD en la fibra adenoviral, se generó por digestión con Pacl del plásmido pAdwtRGD-PH20 y transfección en células HEK293. El adenovirus AdwtRGD, previamente descrito, se caracteriza por contener el tripéptido RGD en la fibra adenoviral (cfr. M. Majem et al., "Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD", Cancer gene therapy 2006, vol. 13, pp. 696-705). El AdwtRGD se construyó mediante digestión del plásmido pVK503 que contiene el genoma de Ad5 completo con la fibra modificada RGD (cfr. I. Dmitriev et al., "An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism", J. Virol. 1998, vol. 72, pp. 9706–13) con Pacl y posterior transfección de células 293.

Construcción del adenovirus ICOVIR17: Para generar este adenovirus se usó el plásmido adenoviral pICOVIR17. Para generar este plásmido, el gen de la fibra adenoviral del plásmido pICOVIR15 fue reemplazado por recombinación homóloga en levaduras por el gen de la fibra seguido del gen de la hialuronidasa PH20 del plásmido pAdwtRGD-PH20 digerido con SpeI/Pacl.

El adenovirus ICOVIR15, proviene del adenovirus Ad Δ 24RGD que se caracteriza por contener la eliminación Δ 24 en la secuencia codificante para la proteína E1a. Esta eliminación afecta a la interacción de E1a con pRB. Ad Δ 24RGD también tiene la inserción del péptido RGD en la fibra adenoviral para aumentar la infectividad del virus. Estas dos modificaciones se describen en K. Suzuki et al., "A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency", Clin Cancer Res 2001, vol. 7, pp. 120–6. A partir de Ad Δ 24RGD, se realizó la inserción de cuatro sitios de unión a E2F-1 y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1a para controlar la expresión de E1a. Así se obtiene ICOVIR15. Esta inserción se realizó mediante sustitución de la secuencia 419-422 del genoma por la secuencia con los 4 sitios de unión a E2F-1 y un sitio de unión a Sp1, de manera que la secuencia final es la que figura en la SEQ ID NO: 3 y la FIG. 1 (b). Para realizarlo se creó un sitio único de corte BsiWI por mutagénesis dirigida en el promotor E1A del pEndK/Spe (cfr. J.E. Carette et al., "Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells", Cancer Res

2004, vol. 64, pp. 2663-7). El sitio de unión a Sp1 se introdujo en el plásmido pEndK/Spe con el sitio BsiWI mediante la ligación de dicho plásmido digerido con BsiWI con los oligonucleótidos Sp1F (5'-GTACGTGACCAAAACCCC GCCCAGCGTCTTGTCATTGGCGTCGACGCT-3' SEQ ID NO: 5) y Sp1R (5'-
 5 GTACAGCGTCGACGCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGGTTCG AC-3' SEQ ID NO: 6) emparejados entre sí. Los sitios de unión a E2F se introdujeron mediante la unión de los oligonucleótidos E2FF2 (5'-GTACGTGCGCGGCTCGTGGCTCTTTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTG GTTCGAA-3' SEQ ID NO: 7) y E2FR2 (5'-GTA^UCTTCGAACCACTTTTACGCG
 10 CCAAATCCTTTTTGCCGCGAAAGAGCCACGAGCCGCCGAC-3' SEQ ID NO: 8) emparejados entre sí, para crear el plásmido pEndK415Sp1E2F2. A continuación se introdujo por recombinación homóloga en levaduras la secuencia CAU, que contiene los elementos necesarios para la replicación del plásmido en levaduras (un centrómero, la secuencia de recombinación autónoma ARS y el marcador de selección URS3, para crear el plásmido
 15 pEndK415Sp1E2F2CAU. Finalmente, se realizó una recombinación homóloga en levaduras del plásmido pEndK415Sp1E2F2CAU digerido con KpnI con el genoma adenoviral del adenovirus AdΔ24RGD para construir el pICOVIR15cau. ICOVIR15 se obtuvo por transfección de la digestión PacI del
 20 pICOVIR15cau a células HEK293.

El virus ICOVIR17, que contiene las mismas modificaciones que ICOVIR15, más la inserción del gen de la hialuronidasa detrás del gen de la fibra adenoviral, se generó por digestión con PacI del plásmido pICOVIR17 y
 25 transfección en células HEK293. La estructura correcta de los genomas de AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17 se verificó por restricción con HindIII. Adicionalmente se secuenció la región del gen PH20 con oligonucleótidos específicos.

30 El casete completo integrado en los genomas de ICOVIR17 y AdwtRGD-PH20 respecto a los genomas de ICOVIR15 y AdwtRGD se representa en la FIG. 1 (c) y en la SEQ ID NO: 4: La secuencia codificante para la proteína PH20 va de la secuencia kozac a la secuencia de poliadenilación.

35 Expresión de una proteína soluble con actividad hialuronidasa por un adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa PH20

Para demostrar que un adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa PH20 expresa una proteína soluble con actividad hialuronidasa se procedió a infectar cultivos celulares de la línea A549 con los virus AdwtRGD, AdwtRGD-PH20, ICOVIR15 e ICOVIR17 usando una multiplicidad de infección que permitía más del 80 % de infección (20 M.OI). Después de 24 h post-infección, el medio de infección se retiró y se añadió medio fresco. Después de 24 h más, el medio fresco (o sobrenadante) se recogió y se concentró por filtración en una columna de Amicon Ultra-4 (Millipore, Billerica, USA), según las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes concentrados se incubaron toda la noche a 37 °C con una solución de ácido hialurónico (1.5 mg/ml) en un tampón fosfato (pH=6) que contenía 0.1 M NaCl y 0.05 % BSA. El ácido hialurónico digerido se analizó mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15 % (cfr. M. Ikegami-Kawai et al., "Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity", Analytical biochemistry 2002, vol. 311, pp. 157-65). Los oligosacáridos resultantes de la digestión del ácido hialurónico se fijaron en la matriz del gel mediante un baño de 30 min en una solución de azul alcian. Finalmente, los oligosacáridos fueron teñidos con nitrato de plata. El resultado se muestra en la FIG. 3. Se demuestra que los sobrenadantes de las células infectadas con los adenovirus que contienen el gen de la hialuronidasa PH20 (AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17) contienen una proteína soluble capaz de digerir el ácido hialurónico (un polisacárido de elevado peso molecular) en oligosacáridos de 5 a más de 50 unidades repetidas de disacáridos.

25

Ausencia de efectos en la replicación viral y en la citotoxicidad in vitro del adenovirus oncolítico que expresa el gen de la hialuronidasa PH20

Para comprobar que la inserción del gen de la hialuronidasa PH20 no afectaba a la replicación viral, se infectaron células de las líneas tumorales A549 y SKMel-28 con los adenovirus oncolíticos ICOVIR15 e ICOVIR17. Después de 4 h post-infección, el medio se retiró y se añadió medio fresco. Los extractos celulares totales se recogieron a diferentes tiempos post-infección y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación para liberar el virus. La cantidad de virus en el extracto celular se determinó por infección en HEK293 y tinción anti-hexón (cfr. M. Majem supra). El resultado se muestra en la FIG. 4. La inserción del gen de la hialuronidasa PH20 no

35

afecta a la replicación del adenovirus ICOVIR17, siendo ésta idéntica a la del adenovirus control.

Para demostrar el efecto de la expresión de la hialuronidasa PH20 en la
 5 citotoxicidad de un adenovirus oncolítico in vitro, se infectaron células de las
 líneas tumorales PC3 y SKMel-28 con diluciones seriadas de los virus
 ICOVIR15 e ICOVIR17. Cinco y seis días post-infección, respectivamente, se
 evaluó espectrofotométricamente la cantidad de proteína como reflejo de la
 supervivencia celular. Los resultados se muestran en la FIG. 5. La capacidad
 10 lítica de ICOVIR17 en las dos líneas tumorales es la misma que la de
 ICOVIR15, indicando que la expresión de la hialuronidasa PH20 no aporta
 ninguna ventaja in vitro.

15 Utilización del adenovirus que se replica y que contiene el gen de la
 hialuronidasa PH20 para tratar eficazmente tumores

Se realizó un experimento in vivo con ratones atímicos de la cepa Balb/c que
 contenían tumores SKMel-28. Un total de 5×10^6 células tumorales de la
 línea SKMel-28 se inyectaron subcutáneamente en cada flanco posterior del
 20 ratón. Después de 21 días los ratones con tumores formados (que alcanzan
 150 mm^3) se distribuyeron en los distintos grupos experimentales (n=10 por
 grupo). Los tumores del grupo control recibieron una única inyección
 intratumoral de tampón salino (20 μl). Los ratones del grupo tratado con
 AdwtRGD-PH20 recibieron una inyección intratumoral (20 μl) de 1×10^8
 25 unidades de transducción del virus por tumor (equivalente a 2×10^9 partículas
 virales ó vp). Los tumores se midieron cada dos o tres días con un pie de rey
 y su volumen se estimó según la fórmula: $V (\text{mm}^3) = A (\text{mm}) \times B^2 (\text{mm}^2) \times \pi/6$,
 en donde A es la longitud mayor o longitudinal, y B es la longitud transversal.
 La FIG. 6 muestra el porcentaje de crecimiento tumoral respecto al inicio del
 30 tratamiento (día 0). Los resultados se presentan como media \pm S.E. La
 existencia de diferencias significativas entre los resultados se calculó usando
 un ensayo no paramétrico de datos no apareados de Mann-Whitney. Las
 curvas de crecimiento se compararon usando un análisis de la variancia. Los
 resultados se consideraron significativos si $p < 0.05$. El tratamiento de los
 35 tumores con el adenovirus AdwtRGD-PH20 dio lugar a una regresión tumoral
 en el 100 % de los tumores tratados. El % de crecimiento tumoral fue
 significativamente menor al grupo control desde los primeros días post-

inyección. El análisis de los tumores al final del experimento reveló una disminución en la cantidad de ácido hialurónico contenido la matriz extracelular de los tumores inyectados con el AdwtRGD-PH20.

- 5 En otro experimento el tratamiento se realizó por inyección intratumoral de ICOVIR15 e ICOVIR17. Se implantaron tumores de la línea celular de melanoma humana SKMel-28 en ratones atímicos Balb C nu/nu, y una vez establecidos fueron tratados por administración intratumoral de PBS o 1×10^8 unidades de transducción de los virus ICOVIR15 e ICOVIR17 (equivalente a
- 10 2×10^9 partículas virales ó vp). Los resultados se muestran en la FIG. 7. El tratamiento con ICOVIR17 demostró actividad oncolítica que resultó en una supresión del crecimiento tumoral significativamente distinta al grupo control (PBS), $p < 0.05$. Al final del experimento los tumores fueron extraídos y pesados. La tabla de la FIG. 7 muestra las medias de volumen tumoral,
- 15 porcentaje de crecimiento tumoral y peso de los tumores al finalizar el experimento. El peso de los tumores inyectados con ICOVIR17 es significativamente inferior al de los tumores tratados con los grupos controles, PBS (# $p < 0.05$) y ICOVIR15 (* $p < 0.05$).
- 20 En otro experimento el tratamiento se realizó por inyección sistémica de ICOVIR15 e ICOVIR17. Se implantaron tumores de la línea celular de melanoma humana SKMel-28 en ratones atímicos Balb C nu/nu, y una vez establecidos fueron tratados por administración en la vena de la cola con PBS o 5×10^{10} partículas físicas de los virus ICOVIR15 e ICOVIR17. Los
- 25 resultados se muestran en la FIG. 8. El tratamiento con ICOVIR17 demostró actividad oncolítica que resultó en una supresión del crecimiento tumoral significativamente distinta a los grupos controles, PBS (# $p < 0.0001$) y ICOVIR15 (* $p < 0.00001$). Al finalizar el experimento, los tumores fueron extraídos y congelados en OCT. Las diferentes secciones de los tumores
- 30 congelados en OCT se trataron con un anticuerpo α -hexon (proteína de la cápside del adenovirus) y se contratiñeron con 4',6'-diaminidino-2-fenilindol. La actividad antitumoral de ICOVIR17 correlaciona con la replicación del adenovirus a nivel intratumoral, evaluada en los tumores obtenidos a día 48 post-inyección. Los tumores tratados con ICOVIR17 presentan grandes
- 35 zonas necróticas, una mejor distribución viral, y menos zonas de células viables que los tumores inyectados con ICOVIR15.

REIVINDICACIONES

1. Adenovirus oncolítico que comprende una secuencia que codifica una enzima hialuronidasa insertada en su genoma.
- 5
2. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 1, donde el adenovirus es un adenovirus humano.
3. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 2, donde el adenovirus humano se selecciona del grupo que consiste en los adenovirus humanos de serotipo 1-51 y derivados de los mismos.
- 10
4. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 3, donde el adenovirus humano es de serotipo 5.
- 15
5. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la enzima hialuronidasa es una hialuronidasa testicular de mamífero.
6. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 5, donde la enzima hialuronidasa es la hialuronidasa testicular humana.
- 20
7. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la secuencia de la enzima tiene eliminada la secuencia correspondiente al dominio de unión a membrana para que la enzima sea soluble.
- 25
8. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la secuencia de la enzima está insertada en el adenovirus oncolítico después de la secuencia de nucleótidos de la fibra adenoviral.
9. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la expresión de la enzima está controlada por un promotor operativo en células animales.
- 30
10. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 9, donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor del citomegalovirus, el promotor principal tardío del adenovirus, el promotor SV40, el promotor de la timidin quinasa del herpes simplex virus, el promotor RSV, el promotor EF1
- 35

alfa, el promotor de la beta-actina, el promotor de la IL-2 humana, el promotor de la IL-4 humana, el promotor de IFN, el promotor de E2F y el promotor humano GM-CSF.

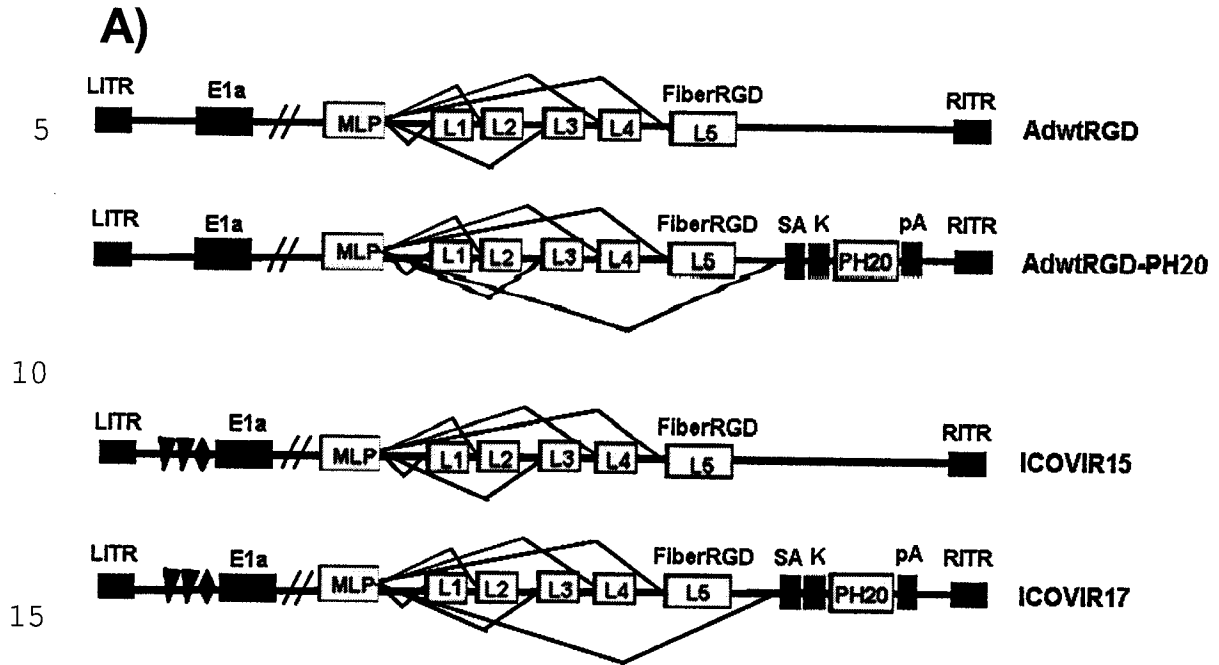
- 5 11. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el adenovirus comprende un promotor específico de tejido o de tumor, donde dicho promotor controla la expresión de uno o más genes del grupo E1a, E1b, E2 y E4, para conseguir replicación selectiva en tumores.
- 10 12. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 11, donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor de E2F, el promotor de la telomerasa hTERT, el promotor de la tirosinasa, el promotor del antígeno específico de próstata, el promotor de la alfa-fetoproteína, y el promotor de la COX-2.
- 15 13. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el adenovirus tiene mutaciones en uno o más genes del grupo E1a, E1b, E4 y VA-RNAs, para conseguir replicación selectiva en tumores.
- 20 14. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el adenovirus tiene modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral.
- 25 15. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde el adenovirus comprende una secuencia que optimiza la traducción proteica de la secuencia que codifica la hialuronidasa.
- 30 16. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el adenovirus comprende una secuencia que promueve la expresión de la secuencia que codifica la hialuronidasa.
- 35 17. Adenovirus oncolítico según la reivindicación 16, donde la secuencia que promueve la expresión se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de corte y empalme que permite el procesamiento del RNA, una secuencia IRES y la secuencia 2A de picornavirus.

18. Adenovirus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, donde el adenovirus comprende uno o más genes insertados en su genoma.

5 19. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del adenovirus oncolítico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-18, junto con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 20. Uso del adenovirus oncolítico definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o de un estado pre-maligno del mismo, en un mamífero incluyendo un humano.

FIG. 1



B)

20 CCAGGTGTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTACTCGGCGGCTCGTGGCTC
 nt 385-419

TTTCCGCGGCAAAAAAGGATTTGCCCGCTAAAAGTGGTTCGAAGTACTCGG
 E2F-1 E2F-1

CGGCTCGTGGCTCTTTCCGCGGCAAAAAAGGATTTGCCCGCTAAAAGTGGT
 E2F-1 E2F-1

25 TCGAAGTACGTGACCACAAACCCCGCCCCAGCGTCTTGTATTGGCGTC
 Sp1

GACGCTGTACGTTTCCGCGGCAAAA
 nt 422-461

FIG. 1

C)

| | | |
|----|--|----------|
| 5 | IIIa | K |
| | <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 100%; height: 1em; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 45%; height: 1em; display: inline-block;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 55%; height: 1em; display: inline-block;"></div> | |
| | <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 100%; height: 1em; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 45%; height: 1em; display: inline-block;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 55%; height: 1em; display: inline-block;"></div> | |
| | <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 100%; height: 1em; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 45%; height: 1em; display: inline-block;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 55%; height: 1em; display: inline-block;"></div> | |
| | <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 100%; height: 1em; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 45%; height: 1em; display: inline-block;"></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: black; width: 55%; height: 1em; display: inline-block;"></div> | |
| 10 | <p>CCACCATGGGAGTGCTAAAATTCA AGCACATCTTTTTCAGAAGCTTTGTTAAATCAAGTGGAGTATCCCAGATA GTTTTACCTTCCTTCTGATTCCATGTTGCTTGA</p> | |
| 15 | <p>ACTCTGAATTTTCAGAGCA CCTCCTGTTATTCCAAATGTGCCTTTCCTCTGGGCCTGGAATGCCCAAG TGAATTTTGTCTTGAAATTTGATGAGCCACTAGATATGAGCCTCTTCT CTTTCATAGGAAGCCCCGAATAAACGCCACCGGGCAAGGTGTTACAAT ATTTTATGTTGATAGACTTGGCTACTATCCTTACATAGATTCAATCACAGG AGTA</p> | |
| 20 | <p>ACTATCAGACCATC TGGACAAAGCTAAGAAAGACATTACATTTTATATGCCAGTAGACAATTTG GGAATGGCTGTTATTGACTGGGAAGAATGGAGACCCACTTGGGCAAGAA ACTGAAACCTAAAGATGTTTACAAGAATAGGTCTATTGAATTGGTTCAG CAACAAAATGTACA</p> | |
| 25 | <p>ACTTAGTCTCACAGAGGCCACTGAGAAAGCAAACA AGAATTTGAAAAGGCAGGGAAGGATTTCTGGTAGAGACTATAAAATTG GGAAAATTACTTCGGCCAAATCACTTGTGGGGTTATTATCTTTTTCCGGA TTGTTACAACCATCACTATAAGAAACCCGGTTACAATGGAAGTTGCTTCA ATGTAGAAATAAAAAGAAATGATGATCTCAGCTGGTTGTGGAATGAAAGC ACTGCTCTTTACCCATCCATTTATTTGAACACTCAGCAGTCTCCTGTAGC TGCTACACTCTATGTGCGCAATCGAGTTCGGGAAGCCATCAGAGTTTCC AAAATACCTGATGCAAAAAGTCCACTTCCGGTTTTTGCATATA</p> | |
| 30 | <p>ACCCGCAT AGTTTTTACTGATCAAGTTTTGAAATTCCTTTCTCAAGATGAACTTGTGTA TACATTTGGCGAAACTGTTGCTCTGGGTGCTTCTGGAATTGTAATATGGG GAACCCTCAGTATAATGCGAAGTATGAAATCTTGCTTGCTCCTAGACAAT TACATGGAGACTATACTGAATCCTTACATAATCAACGTCACACTAGCAGC CAAATGTGTAGCCAAGTGCTTTGCCAGGAGCAAGGAGTGTGTATAAGG AAA</p> | |
| 35 | <p>ACTGGAATTCAAGTGACTATCTTCACCTCAACCCAGATAATTTTGCT ATTCAACTTGAGAAAGGTGGAAAGTTCACAGTACGTGGAAAACCGACAC TTGAAGACCTGGAGCAATTTTCTGAAAAATTTTATTGCAGCTGTTATAGCA CCTTGAGTTGTAAGGAGAAAGCTGATGTA</p> | |
| | <p>AAAAGACACTGATGCTGTTGAT GTGTGTATTGCTGATGGTGTCTGTATAGATGCTTTTCTAAAACCTCCCAT GGAGACAGAAGAACCTCAAATTTTCTACAATGCTTCACCCTCCACACTAT CTTAATAAA</p> | |

polA

FIG. 2

A)

MGVLKFKHIFFRSFKSSGVSQIVFTFLIPCCCLTNFRAPPVIPNVPFLWAW
 5 NAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTIFYVDRLGYYPYIDSITG
 VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARN
 WKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKL
 LRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSWLWNESTAL
 YPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVL
 10 KFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYII
 NVTAAKMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVR
 GKPTLEDLEQFSEKFCSCYSTLSCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFLK
 PPMETEETQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVASL

15

B)

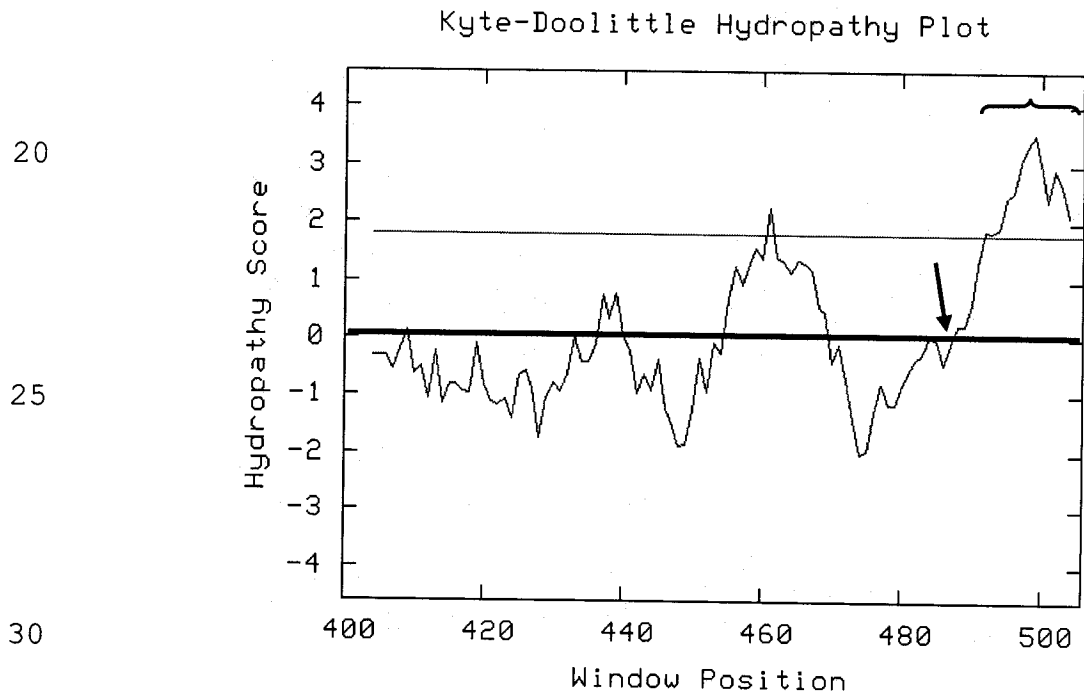


FIG. 3

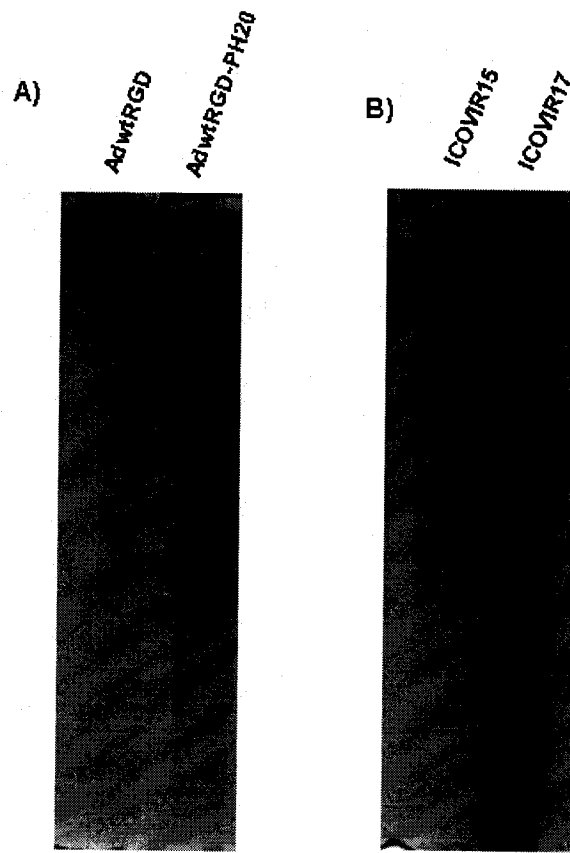
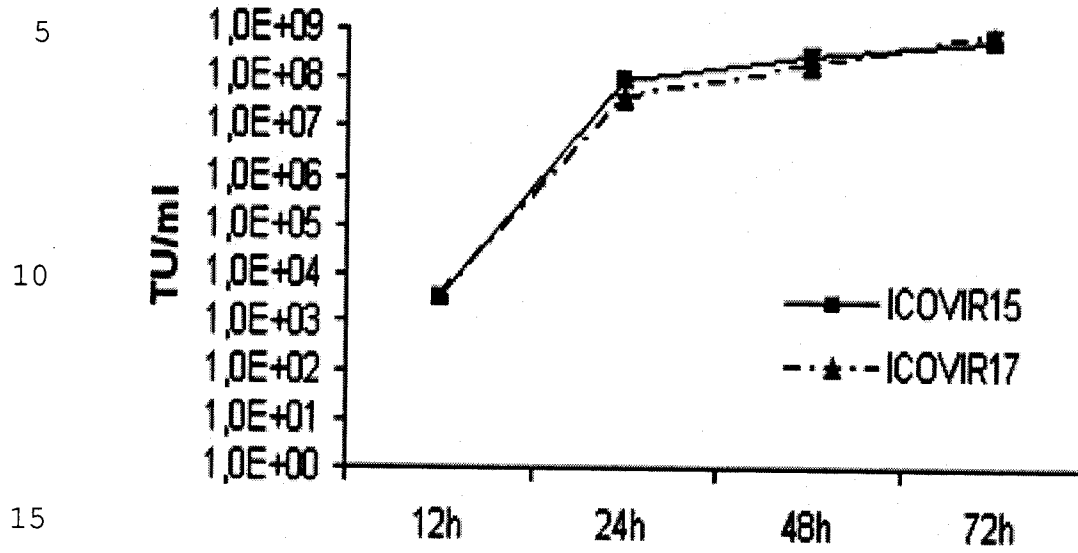


FIG. 4

A)



B)

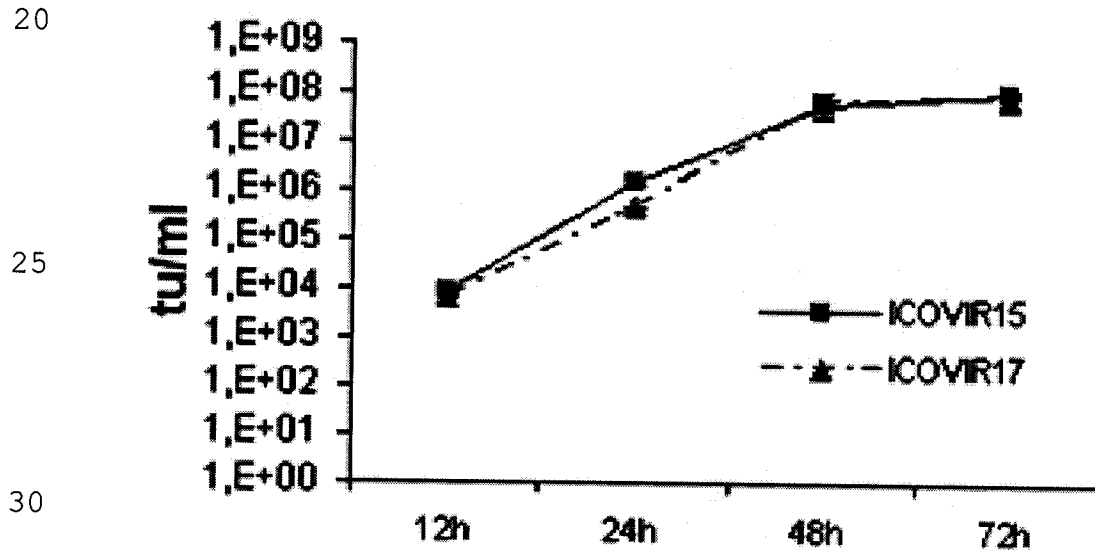
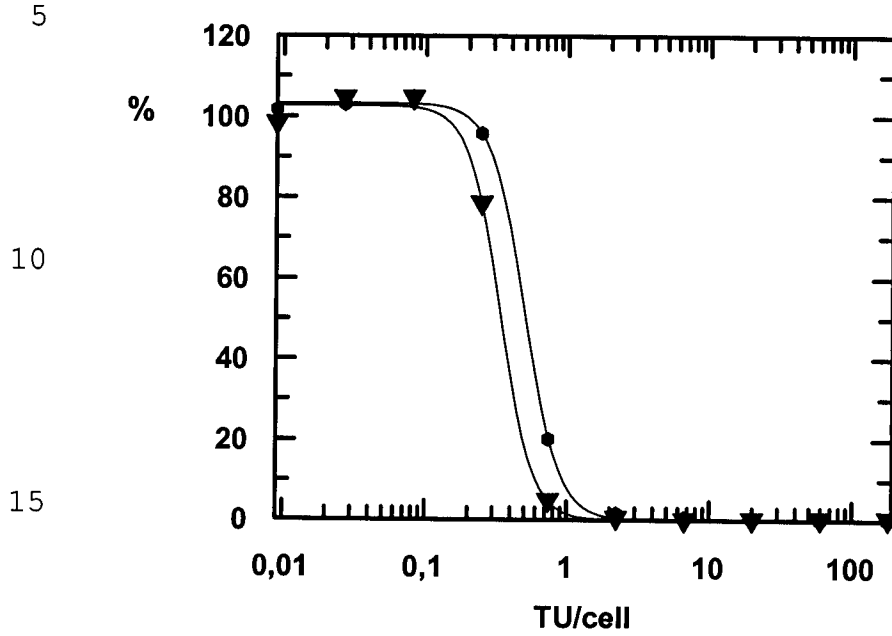


FIG. 5

● ICOVIR15

▼ ICOVIR17

A)



B)

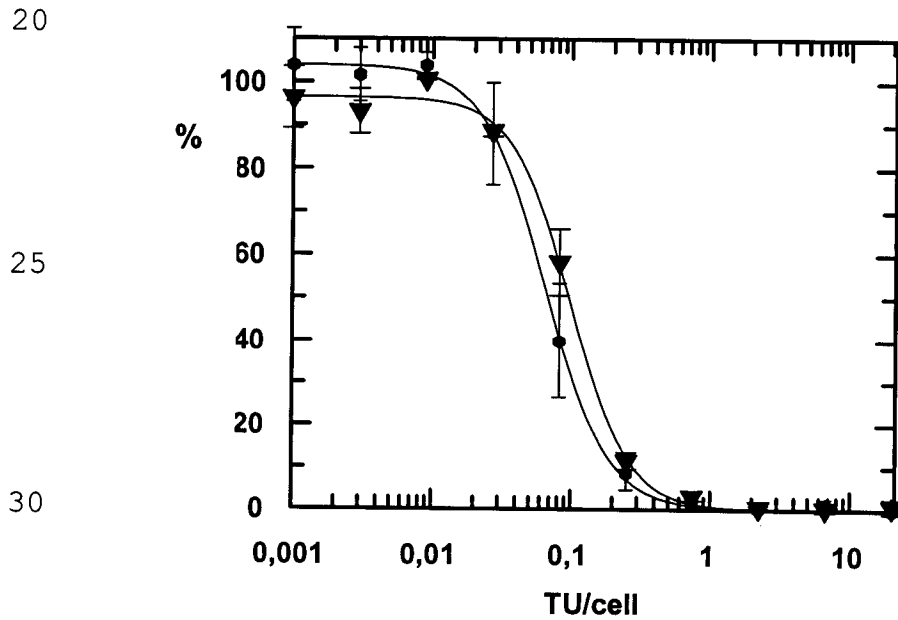
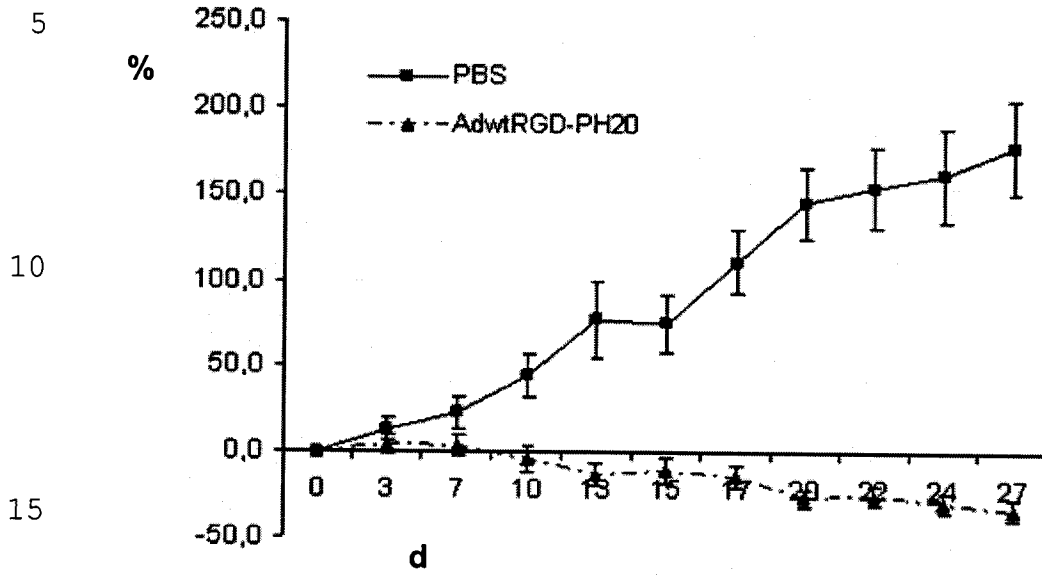


FIG. 6

A)



B)

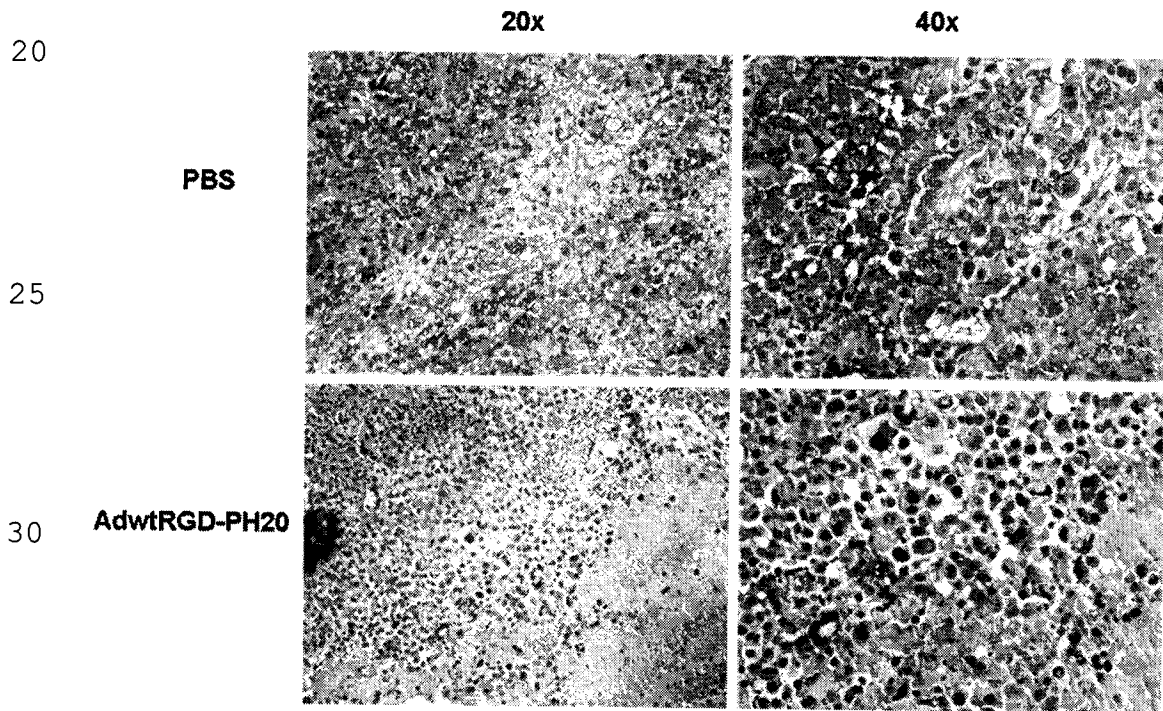
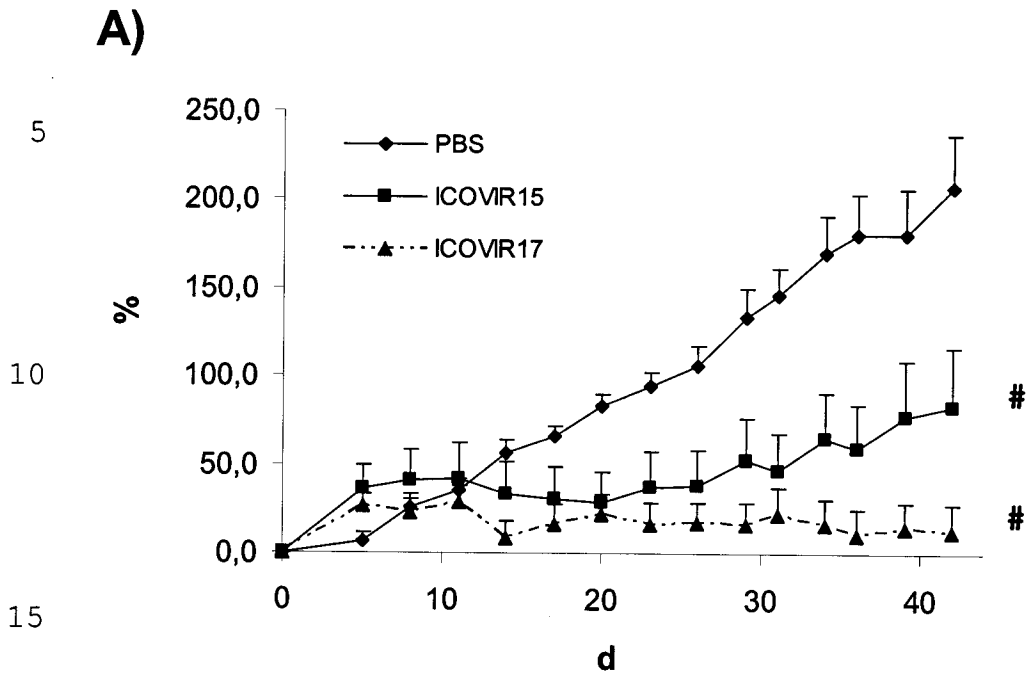


FIG. 7

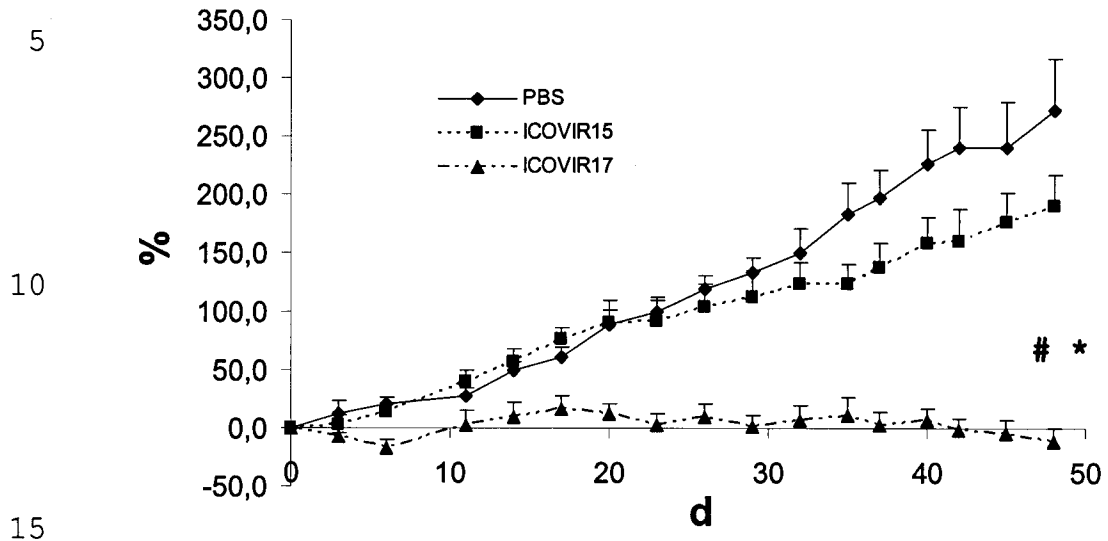


B)

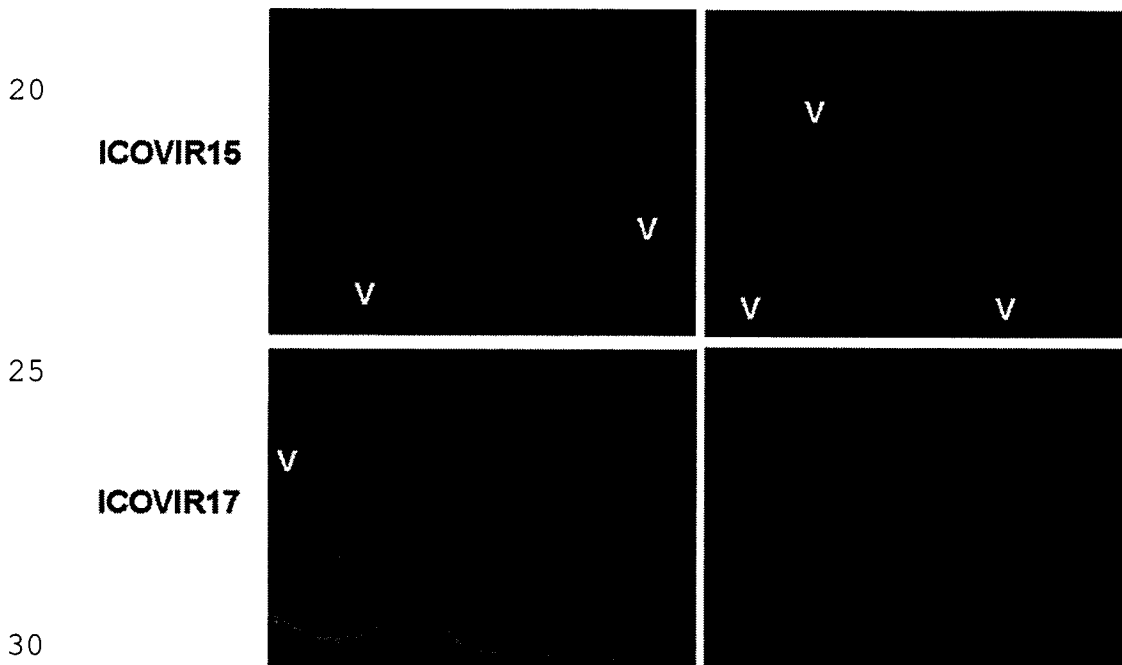
| | Volumen tumoral día 0 | Volumen tumoral día 49 | % crecimiento tumoral día 49 | Peso tumoral día 49 | % peso vs PBS |
|----------|-----------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|---------------|
| PBS | 123.86 | 394.3 | 207.17 | 0.552 | 100 |
| ICOVIR15 | 129.2 | 221.6 # | 82.8 # | 0.342 | 61.95 |
| ICOVIR17 | 128.4 | 137.6 # | 12.2 # | 0.199 * # | 36.12 |

FIG. 8

A)



B)



ES 2 385 251 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE
BELLVITGE
INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA

<120> Adenovirus oncolítics para el tratamiento del cáncer

<130> AVCRI90G

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 509

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
1 5 10 15

Ser Ser Gly Val Ser Gln Ile Val Phe Thr Phe Leu Leu Ile Pro Cys
20 25 30

Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
35 40 45

Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
50 55 60

Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
65 70 75 80

Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
85 90 95

Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
100 105 110

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
115 120 125

Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asp Asn Leu Gly Met Ala Val
130 135 140

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro

ES 2 385 251 A1

145 150 155 160

Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
165 170 175

Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
180 185 190

Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
195 200 205

Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
210 215 220

Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
225 230 235 240

Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
245 250 255

Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
260 265 270

Ala Ala Thr Leu Tyr Val Arg Asn Arg Val Arg Glu Ala Ile Arg Val
275 280 285

Ser Lys Ile Pro Asp Ala Lys Ser Pro Leu Pro Val Phe Ala Tyr Thr
290 295 300

Arg Ile Val Phe Thr Asp Gln Val Leu Lys Phe Leu Ser Gln Asp Glu
305 310 315 320

Leu Val Tyr Thr Phe Gly Glu Thr Val Ala Leu Gly Ala Ser Gly Ile
325 330 335

Val Ile Trp Gly Thr Leu Ser Ile Met Arg Ser Met Lys Ser Cys Leu
340 345 350

Leu Leu Asp Asn Tyr Met Glu Thr Ile Leu Asn Pro Tyr Ile Ile Asn
355 360 365

Val Thr Leu Ala Ala Lys Met Cys Ser Gln Val Leu Cys Gln Glu Gln
370 375 380

Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu

ES 2 385 251 A1

```

385                               390                               395                               400

Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
      405                               410                               415

Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys
      420                               425                               430

Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
      435                               440                               445

Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
      450                               455                               460

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465                               470                               475                               480

Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
      485                               490                               495

Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
      500                               505
  
```

```

<210>  2
<211> 1473
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
  
```

```

<220>
<223> cDNA de la proteína PH20 desde el inicio de transcripción (atg)
      hasta la posición 1467. La cola hidrofóbica de la proteína
      (nucleótidos 1468-1527) ha sido eliminada y no se muestra. Al
      final se ha añadido el codón de parada de la transcripción (taa)
  
```

```

<400>  2
atgggagtgct taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaadc aagtggagta      60
tcccagatag ttttcacett cttctgatt ccatgttgct tgactctgaa ttcagagca      120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttcctc tgggcctgga atgccccaaag tgaatthttgt      180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagcccccgga      240
ataaacgccca cggggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct      300
tacaatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcctta      360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacattht atatgccagt agacaattht      420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccctact gggcaagaaa ctggaaacct      480
aaagatgtht acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt      540
  
```


ES 2 385 251 A1

ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg 600
 gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggccaaatc acttgtgggg ttattatcctt 660
 tttccggatt gttacaacca tcaactataag aaacccgggtt acaatggaag ttgcttcaat 720
 gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac 780
 ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat 840
 cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccgggtt 900
 tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa 960
 cttgtgtata catttggcga aactgttgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga 1020
 accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact 1080
 atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aatgtgtag ccaagtgctt 1140
 tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc 1200
 aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa 1260
 ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatfff attgcagctg ttatagcacc 1320
 ttgagttgta aggagaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctggtgatgt gtgtattgct 1380
 gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt 1440
 ttctacaatg cttcacctc cacactatct taa 1473

<210> 3
 <211> 246
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Secuencia incorporada en el adenovirus Addelta24RGD sustituyendo su secuencia del nucleótido 419 al 422. Los primeros nucleótidos 1-30 y los últimos 208-246 son del Addelta24RGD salvaje.

<400> 3
 ccaggtggtt ttctcaggtg ttttccgctg actcggcggc tcgtggctct ttcgcgcaa 60
 aaaggatttg gcgcgtaaaa gtggttcgaa gtactcggcg gctcgtggct ctttcgcggc 120
 aaaaaggatt tggcgcgtaa aagtggttcg aagtacgtcg accacaaacc ccgcccagcg 180
 tcttgtcatt ggcgtcgacg ctgtacgggg tcaaagttgg cgttttatta ttatagtcag 240
 ctgacg 246

<210> 4
 <211> 1508
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

ES 2 385 251 A1

<220>

<223> Casete completo integrado en los genomas de ICOVIR17 y AdwtRGD-PH20 respecto a los genomas de ICOVIR15 y AdwtRGD.

<400> 4

| | |
|---|------|
| tactaagcgg tgatgtttct gatcagccac catgggagtg ctaaaattca agcacatctt | 60 |
| tttcagaagc tttgttaaat caagtggagt atcccagata gttttcacct tccttctgat | 120 |
| tccatgttgc ttgactctga atttcagagc acctcctggt attccaaatg tgcctttcct | 180 |
| ctgggcctgg aatgccccaa gtgaattttg tcttgaaaaa tttgatgagc cactagatat | 240 |
| gagcctcttc tctttcatag gaagcccccg aataaacgcc accgggcaag gtgttacaat | 300 |
| attttatggt gatagacttg gctactatcc ttacatagat tcaatcacag gagtaactgt | 360 |
| gaatggagga atccccaga agatttcctt acaagaccat ctggacaaag ctaagaaaga | 420 |
| cattacattt tatatgccag tagacaattt gggaatggct gttattgact gggagaatg | 480 |
| gagaccact tgggcaagaa actggaaacc taaagatggt tacaagaata ggtctattga | 540 |
| attggttcag caacaaaatg tacaacttag tctcacagag gccactgaga aagcaaaaca | 600 |
| agaatttgaa aaggcagga aggatttcct ggtagagact ataaaattgg gaaaattact | 660 |
| tcggccaaat cacttgtggg gttattatct ttttccggat tgttacaacc atcactataa | 720 |
| gaaaccggg tacaatggaa gttgcttcaa tgtagaaata aaaagaaatg atgatctcag | 780 |
| ctggttggg aatgaaagca ctgctcttta cccatccatt tatttgaaca ctcagcagtc | 840 |
| tcctgtagct gctacactct atgtgcgcaa tcgagttcgg gaagccatca gagtttccaa | 900 |
| aatacctgat gcaaaaagtc cacttccggg ttttgcatat acccgcatag tttttactga | 960 |
| tcaagtttg aaattccttt ctcaagatga acttgtgtat acatttggcg aaactggtgc | 1020 |
| tctgggtgct tctggaattg taatatggg aaccctcagt ataatgcaa gtatgaaatc | 1080 |
| ttgcttgctc ctgacaatt acatggagac tatactgaat ccttacataa tcaacgtcac | 1140 |
| actagcagcc aaaatgtgta gccaaagtgc ttgccaggag caaggagtgt gtataaggaa | 1200 |
| aaactggaat tcaagtgact atcttcacct caaccagat aattttgcta ttcaacttga | 1260 |
| gaaagtgga aagttcacag tacgtggaaa accgacactt gaagacctgg agcaattttc | 1320 |
| tgaaaaattt tattgcagct gtatagcac cttgagttgt aaggagaaag ctgatgtaaa | 1380 |
| agacactgat gctgttgatg tgtgtattgc tgatggtgct tgtatagatg cttttctaaa | 1440 |
| acctcccatg gagacagaag aacctcaaat tttctacaat gcttcaccct ccacactatc | 1500 |
| ttaataaa | 1508 |

<210> 5

ES 2 385 251 A1

<211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleótido Sp1F

 <400> 5
 gtacgtcgac cacaaccccc gccacgctc ttgtcattgg cgtcgacgct 50

 <210> 6
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleótido Sp1R

 <400> 6
 gtacagcgtc gacgccaatg acaagacgct gggcgggggtt tgtggtcgac 50

 <210> 7
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleótido E2FF2

 <400> 7
 gtacgtcggc ggctcgtggc tctttcgcgg caaaaaggat ttggcgcgta aaagtggttc 60
 gaa 63

 <210> 8
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> oligonucleótido E2FR2

 <400> 8
 gtacttcgaa ccacttttac gcgccaaatc ctttttgccg cgaaagagcc acgagccgcc 60
 gac 63



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200901201

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.05.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N15/861** (2006.01)
A61K48/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| Y | GANESH S. et al.: "Relaxin-expressing fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice", CANCER RES, (2007), vol. 67, no. 9, 2007, páginas 4399-4407, todo el documento. | 1-20 |
| Y | KIM JO O-HANG et al.: "Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy", JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, (2006), vol 98, nº 20, 1 pág. 1482-1493, todo el documento. | 1-20 |
| Y | GANESH S.: "Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models", (2008), CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, nº 12, pág. 3933-3941, todo el documento. | 1-20 |
| Y | JIN CHENG et al.: "Human Matrix Metalloproteinase-8 Gene Delivery Increases the Oncolytic Activity of a Replicating Adenovirus", (2007), MOLECULAR THERAPY, vol. 15, nº 11, pág. 1982-1990, todo el documento. | 1-20 |
| Y | TOOLE B P et al.: "Hyaluronan; A constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells", SEMINARS IN CANCER BIOLOGY, SAUNDERS SCIENTIFIC PUBLICATIONS, PHILADELPHIA, PA, US, (2008), vol. 18, nº 4, pág. 244-250, todo el documento. | 1-20 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
03.07.2012

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

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

C12N, A61K

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

EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.07.2012

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-20 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-20 | NO |

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | GANESH S. et al.: "Relaxin-expressing fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice", CANCER RES, (2007), vol. 67, n.º. 9, 2007, páginas 4399-4407, todo el documento. | |
| D02 | KIM JOO-HANG et al.: "Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy", JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, (2006), vol 98, n.º 20, 1 pág. 1482-1493, todo el documento. | |
| D03 | GANESH S.: "Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models", (2008), CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, n.º 12, pág. 3933-3941, todo el documento. | |
| D04 | JIN CHENG et al.: "Human Matrix Metalloproteinase-8 Gene Delivery Increases the Oncolytic Activity of a Replicating Adenovirus", (2007), MOLECULAR THERAPY, vol. 15, n.º 11, pág. 1982-1990, todo el documento. | |
| D05 | TOOLE B P et al.: "Hyaluronan; A constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells", SEMINARS IN CANCER BIOLOGY, SAUNDERS SCIENTIFIC PUBLICATIONS, PHILADELPHIA, PA, US, (2008), vol. 18, n.º 4, pág. 244-250, todo el documento. | |

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

La presente invención se refiere a adenovirus oncolíticos que tienen una secuencia que codifica una hialuronidasa insertada en su genoma, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden el citado adenovirus y su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados describe adenovirus oncolíticos que tienen una secuencia que codifica una hialuronidasa insertada en su genoma. En consecuencia las reivindicaciones 1-20 cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986.

2.-ACTIVIDAD INVENTIVA

Cualquiera de los documentos D01 y D02 se puede considerar representativo del estado de la técnica más cercano a la invención.

Ambos documentos describen un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia que codifica relaxina insertada en su genoma.

La diferencia entre la información aportada en ambos documentos y la reivindicación 1 es la elección de la hialuronidasa como el gen expresado por el adenovirus oncolítico.

El efecto de esta diferencia es el mismo que el mostrado en ambos documentos, es decir, la degradación de la matriz extracelular de las células tumorales para facilitar la diseminación del adenovirus y mejorar su eficacia.

El problema subyacente de la reivindicación 1 se puede plantear como la provisión de un adenovirus oncolítico alternativo con el mismo propósito.

La solución que proporciona la reivindicación 1 es un adenovirus oncolítico que tienen una secuencia que codifica una hialuronidasa insertada en su genoma.

El documento D05 describe la capacidad de la hialuronidasa para degradar la matriz extracelular de las células tumorales y permitir una diseminación eficiente de los adenovirus oncolíticos que mejora la actividad anti-tumoral, tal y como se describe en D03. En este sentido se considera que la capacidad de degradar la matriz extracelular así como su posible uso para mejorar la diseminación y eficacia de un adenovirus oncolítico era información accesible para un experto en la materia con anterioridad la presentación de la solicitud de patente. A la vista de la mejora proporcionada por la expresión de una enzima que degrada la matriz extracelular por el adenovirus oncolítico en vez de la coadministración de la hialuronidasa con el adenovirus oncolítico, el experto en la materia habría conseguido el objeto de la reivindicación 1 sin esfuerzo inventivo.

Las reivindicaciones dependientes también carecen de actividad inventiva ya que corresponden a realizaciones que se consideran rutinarias en el estado de la técnica.

Finalmente, los adenovirus oncolíticos descritos en el estado de la técnica se usan para el tratamiento del cáncer. En este sentido, los usos terapéuticos de las reivindicaciones 19 y 21 también carecen de actividad inventiva.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-20 no cumplen el requisito establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.