

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 347**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03729255 .4**  
96 Fecha de presentación: **14.01.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1466001**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

54 Título: **Virus con potencia lítica mejorada**

30 Prioridad:  
**14.01.2002 EP 02075108**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.07.2012**

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

72 Inventor/es:  
**VAN BEUSECHEM, Victor Willem y  
GERRITSEN, Willem-Ronald**

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

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).

ES 2 385 347 T3

## DESCRIPCIÓN

Virus con potencia lítica mejorada.

Sector de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de modificación genética, biotecnología y medicina. En particular, la presente invención da a conocer la replicación competente de adenovirus recombinantes con una potencia mejorada para lisar las células en las que se replican. Como resultado, los adenovirus de la presente invención se replican más rápido dentro de una población de células. Por lo tanto, la presente invención da a conocer la preparación eficiente de adenovirus recombinantes y de factores, tales como proteínas, codificadas por dichos adenovirus recombinantes, así como medios eficaces para erradicar ciertas poblaciones de células. La presente invención  
10 encuentra aplicaciones útiles en las áreas de producción de adenovirus recombinantes, producción de proteínas recombinantes, producción de vacunas y tratamientos médicos basados en la eliminación de ciertas células del organismo, tales como por ejemplo células cancerosas. El alcance de protección se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

15 Los adenovirus recombinantes se generan a partir del genoma de adenovirus mediante ingeniería genética. Esta ingeniería genética a menudo implica la inserción de ADN heterólogo en el genoma del adenovirus, que incluye sin constituir limitación, al ADN que codifica un producto terapéutico. Se ha de entender, sin embargo, que el término adenovirus recombinante también se refiere a adenovirus en los que se han eliminado partes del genoma del virus sin inserción de ADN heterólogo. Otro ejemplo de un adenovirus recombinante es un adenovirus quimérico que contiene partes de los genomas de adenovirus diferentes.

20 En el presente documento, se distinguen dos tipos de adenovirus recombinantes, es decir, adenovirus deficientes de replicación y adenovirus competentes de replicación. En los adenovirus deficientes de replicación, se eliminan partes del genoma del virus que son esenciales, como mínimo, para una etapa del ciclo de vida infeccioso del adenovirus (también referido en el presente documento como que le falta la función de replicación). Por lo tanto, dichos virus recombinantes son deficientes para la replicación, lo que significa que dicho virus recombinante solo es incapaz de  
25 completar el ciclo de vida infeccioso del virus. Este tipo de adenovirus recombinante, por lo tanto, sólo puede replicarse en una célula cuando la función de replicación que falta, codificada por dichas partes eliminadas del genoma, se proporcionan a dicha célula por otros medios. Por ejemplo, ese es el caso de las denominadas líneas celulares de empaque, en las que la función de dichas partes eliminadas es proporcionada en el genoma de dichas células, véase por ejemplo, el documento WO 01/44280. Tras la infección por un virus deficiente de replicación, dichas células se pueden complementar para la función de replicación que falta *in trans*, resultando en la replicación del virus. Ejemplos de adenovirus deficientes de replicación, a menudo referidos como adenovirus incompetentes de replicación, se describen, por ejemplo, en los documentos WO 95/12660, WO 98/46779, WO 98/46781, WO  
30 00/71078 y US 5.932.210.

35 En el presente documento, se define adenovirus competente de replicación como que el virus comprende, como parte de su genoma, la función para replicarse, como mínimo, en un tipo de células diana, en los que la función de replicación solamente es dependiente de las funciones de replicación proporcionadas por el virus, en combinación con la maquinaria celular endógena de las células diana.

40 El término "función para replicarse" incluye los factores tales como proteínas, codificadas por el virus, necesarios para la replicación del virus en la célula diana (también referidos en el presente documento como factores de replicación viral). Tal como se mencionó anteriormente, 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 son complementados por factores exógenos codificados en las células diana. De esta manera, los virus, en los que la replicación es dependiente de una o más funciones de replicación, se han  
45 eliminado del virus, pero se han introducido en la célula diana, se definen que son 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 recombinantes competentes para la replicación, es decir, en los que los genes virales que codifican los factores de replicación virales, esenciales para la regulación de la replicación del virus en las células diana, están presentes en el genoma viral.

50 En un primer tipo de adenovirus recombinantes competentes para la replicación, dichas partes que son esenciales, como mínimo, para una etapa del ciclo de vida infeccioso del adenovirus, también se han eliminado, pero las funciones esenciales de dichas partes son complementadas por la inserción de casetes de expresión funcionales para la proteínas heterólogas que proporcionan dichas funciones esenciales en el genoma del adenovirus recombinante. Este tipo de adenovirus recombinante es referido en el presente documento como un adenovirus heterológamente transcomplementado y, por lo tanto, es considerado como competente para la replicación, según la  
55 definición presentada en el presente documento.

Un segundo tipo de adenovirus recombinante competente para la replicación es el denominado adenovirus condicionalmente de replications (CRAd). En los CRAd, se eliminan dichas una o más partes del genoma del

adenovirus, incluyendo las partes que son esenciales, como mínimo, para una etapa del ciclo de vida infeccioso del adenovirus bajo ciertas condiciones fisiológicas (también referidas en el presente documento como "primeras condiciones"), pero no bajo otras determinadas condiciones fisiológicas (también referidas en el presente documento como "segundas condiciones"). Dichas segunda y primera condiciones, por ejemplo, podrían ser dictadas por las condiciones fisiológicas que existen en un tipo particular de células (también referidas en el presente documento como "segundas células"), pero no en otros tipos de células (también referidas en el presente documento como "primeras células"). Dicho segundo tipo de células, por ejemplo, es una célula derivada de un tipo particular de tejido, en el que dicha célula contiene una proteína que no está o está menos presente que en células de otros tejidos (primer tipo de células). Un ejemplo de un segundo tipo de célula es una célula que ha perdido el control adecuado del crecimiento celular, tal como por ejemplo una célula cancerosa, en la que dicha célula carece de una proteína que está presente en las células que no tienen un control adecuado del crecimiento celular o en la que dicha célula ha ganado la expresión (o sobreexpresión) de una proteína que no está o está menos presente en células que no tienen un control adecuado del crecimiento celular. Otro ejemplo de dichas segundas condiciones son las condiciones que existen en una etapa particular del ciclo celular o en una etapa de desarrollo particular de la célula, en las que una determinada proteína es específicamente expresada. Por tanto, los CRAd pueden ser diseñados de manera que, la replicación de los mismos es posible en células particulares, tales como células cancerosas o un tipo particular de célula cancerosa, mientras que en células normales, la replicación de los CRAd no es posible. Esto es conocido en la técnica y se hace una revisión, por ejemplo, por Heise y Kirn, J. Clin. Invest. 105(2000): 847-851; Alemany y otros, Nat. Biotech. 18(2000): 723-727; Gomez-Navarro y Curiel, Lancet Oncol. 1 (2000): 148-158).

En un tercer tipo de adenovirus competente para la replicación, no se han eliminado partes del genoma del adenovirus o dichas partes del genoma del adenovirus que se eliminan no incluyen las partes que son esenciales, como mínimo, para una etapa del ciclo de vida infeccioso del adenovirus. Este tipo de adenovirus competente de replicación tiene una capacidad para replicarse en células como lo hace el adenovirus parenteral no modificado y, por lo tanto, es referido como adenovirus competente para la replicación verdadera. En general, la replicación de adenovirus recombinantes está restringida a células de especies animales particulares o grupos de especies animales. Por ejemplo, adenovirus recombinantes derivados de adenovirus humanos pueden tener un ciclo de vida completo en células humanas, con una replicación ineficiente que ocurre a elevadas dosis en células de otras especies.

La producción de adenovirus recombinantes habitualmente comienza con ingeniería genética, como mínimo, de una parte del genoma del adenovirus mediante técnicas de biología molecular estándares conocidas en la técnica. En algunos casos, una construcción de adenovirus recombinante de tamaño completo comprende todos los elementos requeridos para que se realice la replicación, como mínimo, en un tipo de célula, en otros casos, el genoma del adenovirus recombinante se separa en dos o más construcciones que comparten homología de secuencias. A continuación, el genoma del adenovirus (comprendido por una o más construcciones) es introducido en las células que permiten la replicación de dichos adenovirus recombinantes mediante métodos de transferencia de ADN conocidos en la técnica, incluyendo sin constituir limitación, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lipofectamina electroporación y similares. Los procedimientos que utilizan un genoma de adenovirus que es separado en más de una construcción se basan en la recombinación homóloga entre las partes del genoma del adenovirus que son compartidas por las construcciones que están presentes en dichas células para constituir un genoma de adenovirus recombinante completo.

Después 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 propagarse a otras células en el cultivo. El adenovirus recombinante también puede aislarse del medio de cultivo o de lisados de células en las que se replica dicho adenovirus recombinante. El adenovirus recombinante aislado puede utilizarse, a continuación, para reinfectar nuevas células para propagar y expandir más dicho adenovirus recombinante. Además, dichos adenovirus recombinantes se pueden administrar a un cuerpo animal o humano para infectar células *in vivo*. Esta administración se puede llevar a cabo a través de diversas vías, incluyendo pero sin constituir limitación, la inyección directa en un tejido, administración oral, inyección en la circulación sanguínea, inhalación, inyección en una cavidad del cuerpo y la aplicación en la superficie de una cierta área del cuerpo. Seguido de la infección de dichas células *in vivo*, el adenovirus recombinante se puede replicar y propagar a otras células *in vivo*, con la condición de que las células infectadas soporten la replicación de dicho adenovirus recombinante.

Los adenovirus deficientes de replicación no se replicarán en la mayoría de las células en un cuerpo animal, excepto tipos de células especiales que complementan las partes del genoma del adenovirus que son esenciales para el ciclo de vida infeccioso del adenovirus. Dichos tipos de células especiales incluyen ciertas células cancerosas (estimuladas por factores de crecimiento) que muestran lo que es generalmente referido como "actividad similar a E1A" (Spergel y Chen-Kiang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88(1991): 6472-6476; Rancourt y otros, Clin. Cancer Res. 5(1999): 43-50; Steinwaerder y otros, Hum. Gene Ther. 11(2000): 1933-1948). Debido a que la presente invención requiere que el genoma del adenovirus recombinante comprenda la función de replicación y tenga capacidad lítica en las células diana deficientes en la vía de apoptosis dependiente de p53, los adenovirus deficientes de replicación no son útiles para la presente invención. Los adenovirus competentes para la replicación verdaderos se replicarán en muchas células diferentes en un cuerpo animal, con la condición de que sean derivadas de adenovirus con tropismo de especies correcto y que dichas células expresen receptores de superficie para dichos adenovirus. Los CRAd solamente se replicarán en células en las que existen condiciones particulares que son requeridas para la

replicación de los CRAAd. Los CRAAd son diseñados para que cumplan los requisitos específicos para la replicación en un tipo de célula (primer) seleccionado y no en otro tipo de células (segundo). Esta propiedad hace a los CRAAd particularmente útiles para varias realizaciones de la presente invención en las que se pretende tratar una enfermedad mediante la replicación lítica específica de adenovirus recombinante, según la presente invención en células enfermas de un cuerpo animal o humano, lo que resulta en la eliminación específica de dichas células enfermas de dicho cuerpo.

El proceso de replicación del adenovirus comprende las etapas siguientes: (1) unión de la partícula de adenovirus a la superficie de la célula huésped a través de moléculas receptoras, (2) internalización de la partícula de virus por endocitosis, (3) escape del endosoma en el citoplasma y transporte hacia el núcleo de la célula, durante el que la partícula de virus está parcialmente rota, (4) importación del genoma de ADN del adenovirus en el núcleo de la célula, (5) expresión de las proteínas del adenovirus codificadas por las regiones tempranas en el genoma del adenovirus, (6) replicación del genoma del adenovirus, (7) expresión de proteínas del adenovirus codificadas por las regiones tardías en el genoma del adenovirus, (8) ensamblaje de partículas de adenovirus de la progenie e inclusión de los genomas de adenovirus de la progenie en estas partículas, (9) inducción de la muerte celular, dando lugar a la (10) liberación de la progenie del adenovirus de la célula.

Importantes células diana naturales para los adenovirus son las células epiteliales que no se dividen. Estas células carecen de maquinaria activa para la síntesis de ADN. Por lo tanto, con el fin de replicar su genoma de ADN en estas células, los adenovirus inducen la maquinaria de síntesis de ADN celular. Proteínas de adenovirus codificadas por la región temprana 1A (E1A) son potentes inductores de la síntesis de ADN, el crecimiento y transformación, que llevan a cabo mediante la formación de complejos con proteínas celulares implicadas en el control del ciclo celular. Estos efectos de E1A provocan citotoxicidad y la inducción de muerte celular programada o apoptosis. En diferentes líneas celulares, la apoptosis dependiente de p53, así como la apoptosis independiente de p53 se ha documentado después de infección por adenovirus (Teodoro y Branton, J. Virol 71 (1997) :1739-1746; y referencias en el mismo).

Dos proteínas codificadas por la región temprana 1B (E1B), E1B-19kDa y E1B-55kDa, y la proteína orf6 de la región temprana 4 (E4orf6) suprimen la citotoxicidad y la muerte inducida por E1A. Las proteínas E1B-55kDa y E4orf6 cooperan para suprimir la apoptosis, como mínimo, en parte, mediante la formación de un complejo con p53 e inhibe la transactivación mediada por p53, así como promueve la degradación de p53. La proteína E1B-19kDa interactúa con proteínas de la familia bcl-2 para inhibir la vía de apoptosis dependiente de caspasa-9. La supresión de la apoptosis evita la muerte celular prematura, lo que permite al adenovirus completar su ciclo de vida en la célula. Por el contrario, en las fases tardías de la infección, la muerte y lisis celular promueven la liberación de la progenie del virus de la célula. Un importante mecanismo utilizado por los adenovirus para lograr esto es mediante la inducción de apoptosis. Entre las proteínas de los adenovirus que mostraron participar en la inducción de la apoptosis tardía o la lisis celular eficiente en las etapas tardías de la infección por un mecanismo actualmente sin resolver se incluye la proteína E4orf4 (Shtrichman y Kleinberger, J. Virol. 72 (1998) :2975-2982; Marcellus y otros, J. Virol. 72 (1998): 7144-7153) y la glicoproteína de la membrana nuclear E3-11.6kDa, también denominada proteína de muerte de adenovirus (ADP) (Tollefson y otros, J. Virol. 70 (1996) :2296-2306).

Las células y las líneas celulares cancerosas son el resultado de la transformación neoplásica. Los eventos genéticos esenciales de la transformación neoplásica incluyen la activación de protooncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores. Un actor importante en este sentido es el gen que codifica la proteína p53 supresora de tumores. La pérdida de la función normal de p53 se asocia con resistencia a la apoptosis, transformación celular *in vitro* y desarrollo de tumores *in vivo*. De hecho, en aproximadamente el 50% de los cánceres humanos el gen que codifica la p53 no es funcional mediante eliminación 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). También en las células cancerosas que expresan la proteína p53 no modificada, la apoptosis se ve obstaculizada. Como mínimo, en algunos casos y tal vez en todos los casos, esto es el resultado de la inactivación funcional de p53 en estas células.

Por ejemplo, la pérdida de la proteína p14ARF supresora de tumores o la sobreexpresión de la proteína MDM2 puede dar lugar 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). Otro ejemplo es la inactivación funcional de p53 como resultado de la unión antagónica de la proteína E6 del virus del papiloma humano (VPH) en carcinomas cervicales (Scheffner y otros, Cell 63 (1990): 1129-1136) o del antígeno nuclear asociado a latencia del herpesvirus-8 en el sarcoma de Kaposi (Friborg y otros, Nature 402 (1999): 889-894). Así, en muchos, si no en todos los tipos de cáncer *in vivo* y líneas celulares derivadas de cáncer o inmortalizadas, la apoptosis *in vitro* se ve obstaculizada como resultado de una o más lesiones en la vía dependiente de p53.

La pérdida de la función de p53 también ha sido documentada en otras enfermedades que implican supervivencia celular inadecuada, tal como por ejemplo artritis reumatoide (Firestein y otros, J. Clin. Invest. 96 (1995) :1631-1638; Firestein y otros, Am. J. Pathol. 149 (1996) :2143-2151; Firestein y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) :10895-10900) y en la hiperplasia vascular de células del músculo liso (Speir y otros, Science 265 (1994): 391-394; Kovacs y otros, Am. J. Pathol. 149 (1996): 1531-1539).

De modo interesante, se ha observado que los adenovirus replicantes exterminan líneas de células p53 funcionales más rápidamente que líneas de células deficientes en p53 (Hall y otros, *Nature Med.* 4 (1998): 1068-1072; Goodrum y Ornelles, *J. Virol.* 72 (1998): 9479-9490; Dix y otros, *Cancer Res.* 60(2000): 2666-2672). La función de las proteínas codificadas por adenovirus, en particular la proteína E1B-55kDa, en relación con la muerte celular dependiente de p53 aún no está clara. Por un lado, se encontró que los adenovirus no modificados, así como los adenovirus recombinantes que carecen de E1B-55kDa, destruyeron células cancerosas de tipo p53 no modificada más rápidamente que células deficientes de p53, lo que sugiere que la proteína E1B-55kDa no juega un papel en el proceso de muerte celular rápida (Hall y otros, *Nature Med.* 4(1998): 1068-1072; Dix y otros, *Cancer Res.* 60(2000): 2666-2672). Por otra parte, los adenovirus que expresan E1B-55kDa o mutantes de E1B-55kDa capaces de formar un complejo con p53 destruyeron células no modificadas de p53 más rápidamente que los adenovirus que expresan mutantes de E1B-55kDa incapaces de formar un complejo con p53, lo que sugiere que la proteína E1B-55kDa puede jugar un papel en la inducción de muerte celular por adenovirus (Dix y otros, *Cancer Res.* 60(2000): 2666-2672; Ridgway y otros, *Virology* 237 (1997): 404-413).

La proteína p53 es la coordinadora central del puesto de control del ciclo celular con daño inducido. En una célula perturbada, p53 puede inducir simultáneamente detención del crecimiento y apoptosis. La p53 ejerce estos efectos mediante el funcionamiento de un factor de transcripción específico que controla la expresión de un panel grande de genes involucrados en el crecimiento celular, reparación del ADN, producción de óxido nítrico y degradación proteica (Polyak y otros, *Nature* 389 (1997): 237-238; E1-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 las referencias en el mismo). La inducción de la apoptosis por p53 está mediada, como mínimo en parte, por la activación de genes de muerte proapoptóticos de la familia bcl-2, tales como bax, bak y bcl-x<sub>s</sub> (Miyashita y Reed, *Cell* 80 (1995): 293 - 299; Han y otros, *Genes Dev.* 10 (1996): 461-477). Las proteínas efectoras inmediatas de p53, así como la propia p53 se orientan hacia las mitocondrias, liberando así el citocromo c en el citosol para activar la cascada de caspasas a través del complejo iniciador caspase-9/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). Existen evidencias de análisis de mutaciones de que las funciones de activación de la transcripción de p53 responsable de la detención del crecimiento y la apoptosis puede ser diseccionadas. Por ejemplo, la proteína Q22/S23 mutante de p53 ha anulado la función de detención del crecimiento, pero sólo ha atenuado la capacidad de inducción de apoptosis (Venot y otros, *Oncogene* 18 (1999) :2405-2410). Por otra parte, se han identificado varios mutantes en el aminoácido 175 de p53 que retienen la función de detención del ciclo celular pero son defectuosos en la inducción de la apoptosis (Ryan y Vousden, *Mol. Cell. Biol.* 18(1998): 3692-3698). Además, se han identificado varios homólogos de p53, incluyendo p73 y p63, que comparten parte de las funciones con p53 (Kaghad y otros, *Cell* 90 (1997): 809-819; Yang y otros, *Mol. Cell* 2 (1998): 305-316). En presencia de la proteína E1B-19kDa del adenovirus, que se une e inactiva genes de muerte proapoptóticos de la familia bcl-2, se hace evidente la vía de detención del crecimiento dependiente de p53. Por otra parte, la apoptosis es dominante sobre la detención del crecimiento (Han y otros, *Gen. Dev.* 10 (1996) :461-477).

Los adenovirus recombinantes están encontrando cada vez mayor utilidad para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que implican supervivencia celular no adecuada. En particular, los CRAd se han desarrollado para replicarse en las células cancerosas y destruirlas. Dicho CRAd específico para el cáncer representa una nueva y muy prometedora clase de agentes contra el cáncer (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 cualquiera de dos estrategias alternativas. En la primera estrategia, la expresión de un gen temprano esencial del adenovirus es controlada por un promotor específico del tumor (Rodríguez y otros, *Cancer Res.* 57 (1997) :2559-2563; Hallenbeck y otros, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) :1721-1733). La segunda estrategia implica la introducción de mutaciones en los genes virales que suprimen la interacción de las proteínas codificadas con proteínas celulares, necesarias para completar el ciclo de vida viral en células normales, pero no en células tumorales (Bischoff y otros, *Science* 274 (1996) :373-376; WO94/18992; WO97/30732; 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). Durante su replicación en las células tumorales, los CRAd destruyen estas células por inducción de lisis, un proceso también referido como "oncolisis". La liberación de la progenie viral de las células tumorales lisadas ofrece el potencial de amplificar los CRAd in situ y lograr la propagación lateral a las células vecinas en un tumor sólido, expandiendo así el efecto oncolítico. La restricción de la replicación del CRAd a las células tumorales o hiperproliferativas dicta la seguridad del agente, mediante la prevención de la lisis de células de tejidos normales. En la actualidad, ya se están evaluando tratamientos contra el cáncer 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 contra el cáncer de los CRAd como agentes únicos en seres humanos ha sido limitada (Kirn y otros, *Nature Med.* 4 (1998): 1341-1342; 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). Por lo tanto, existe una clara necesidad en el sector de los tratamientos del cáncer de aumentar la potencia de adenovirus recombinantes como agentes oncolíticos. Esto podría lograrse mejorando sus capacidades de replicación y de lisis.

Se han seguido varios enfoques destinados a mejorar las capacidades de replicación y de lisis de los adenovirus recombinantes, o evitar la pérdida de estas funciones a partir del adenovirus no modificado. Se ha demostrado que es mejor retener la región E3 del adenovirus en un adenovirus recombinante (Yu y otros, *Cancer Res.* 60 (2000): 4200-4203) o, en el caso de que se elimine la mayoría de la región E3, como mínimo, retener el gen que codifica la proteína E3-11,6kDa (Tollefson y otros, *J. Virol.* 70 (1996) :2296-2306; Doronin y otros, *J. Virol.* 74 (2000) :6147-6155). Además, la replicación y la lisis celular de los adenovirus recombinantes se han mejorado mediante la incorporación de genes citotóxicos (Zhang y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (1996): 4513-4518; Freytag y otros, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998): 1323-1333; Wildner y otros, *Gene Ther.* 6 (1999) :57-62). También se demostró que los adenovirus recombinantes son más potentes para destruir células cancerosas cuando contienen la región E1A completa, pero carecen de la proteína E1B-19kDa (Martín Duque y otros, *Cancer Gene Ther.* 6 (1999) :554-563; Sauthoff y otros, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) :379-388). Por último, la liberación de un adenovirus recombinante con regiones E1 y E3 eliminadas de células HeLa de cáncer de cuello uterino fue mejorada por la inducción de apoptosis en estas células (Mi y otros, *Hum. Gene Ther.* 12 (2001) :1343-1352). En este último caso, es fundamental que la apoptosis fuese inducida después de que se había completado el ensamblaje de la progenie del virus en la célula. La inducción de la apoptosis prematura durante la replicación del ADN viral puso en peligro la producción del virus.

Breve descripción de la invención

En muchos casos, se prefiere que un adenovirus recombinante se someta a un ciclo de vida rápido en una célula huésped. Cuando un adenovirus recombinante se produce o cuando un adenovirus recombinante se utiliza como un vector para producir una proteína en las células, un ciclo de vida del adenovirus rápido acelera el proceso de producción. Cuando un adenovirus recombinante se utiliza como un medio para destruir una población de células, un ciclo de vida rápido se sumará a la eficacia del proceso. Un ciclo de vida rápido es de particular importancia para la utilización de un adenovirus recombinante in vivo. Los adenovirus inducen potentes respuestas inmunes en el cuerpo de los animales que inactivan dichos adenovirus. Esto limita la duración de la replicación in vivo de un adenovirus recombinante administrado. Un ciclo de vida más rápido, por lo tanto, permitirá más ciclos de producción de la progenie del virus en el lapso de tiempo entre la administración y la inactivación del adenovirus recombinante. Una situación en la que un ciclo de vida rápido de un adenovirus recombinante es de particular importancia in vivo es en el contexto del tratamiento de una enfermedad que implica supervivencia celular no adecuada. Un ejemplo paradigmático de dicha enfermedad es el cáncer. La potencia anticancerosa de un adenovirus recombinante que se administra a un tumor *in vivo* depende de (1) la eficacia a la que el virus se difunde por todo el tumor mediante la producción de progenie que puede infectar células tumorales vecinas, y (2) la eficacia a la que el virus destruye las células tumorales a través de la replicación y lisis de dichas células. Por lo tanto, 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 en el tiempo, y, por consiguiente, una destrucción del tumor más eficaz.

Por lo tanto, un objetivo importante de la presente invención es dar a conocer adenovirus recombinantes que tienen un tiempo de replicación corto en una célula huésped. Se entiende que dicho tiempo de replicación se refiere al tiempo entre la entrada del adenovirus recombinante en la célula y la liberación de la progenie de dicho adenovirus recombinante de la célula.

Un segundo objetivo de la presente invención es dar a conocer adenovirus recombinantes que tienen una capacidad lítica rápida, es decir, se refiere a que las células infectadas son lisadas preferentemente en 7 días, más preferentemente en 4 días y lo más preferente en 2 días. Se entiende que una capacidad lítica rápida se refiere a un tiempo corto requerido para lisar una célula huésped después de la entrada del adenovirus recombinante en dicha célula huésped.

En un ejemplo preferente, dicha célula huésped en la que dicho adenovirus recombinante tiene un tiempo de replicación corto y/o una capacidad lítica rápida es una célula con una capacidad insuficiente para responder a una pérdida del punto de control del ciclo celular, es decir, defectuosa en la vía de apoptosis de p53 (también referida en el presente documento como vía de apoptosis dependiente de p53). Preferentemente, dicha célula es una célula humana. Ejemplos no limitativos de células huésped según la presente invención son células cancerosas o tumorales, células artríticas, células vasculares del músculo liso hiperproliferativas y células infectadas con un virus de ADN que no sea dicho adenovirus recombinante.

En una variante, dicha célula huésped es una célula que está siendo cultivada *in vitro*. En otra variante, dicha célula huésped es una célula en un cuerpo animal, en la que es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano.

En un ejemplo preferente, dicha capacidad lítica rápida es el resultado de la inducción de muerte celular, en el que es preferente que dicha muerte celular involucre la vía de apoptosis dependiente de p53.

El concepto de la presente invención se basa en la siguiente línea de razonamiento:

(1) Aumentar la velocidad de replicación de un adenovirus recombinante en una célula, como mínimo, se necesita aumentar una etapa del proceso de replicación.

(2) La etapa del ciclo de vida del adenovirus que más determina de forma más crítica la velocidad de replicación del virus es la etapa que requiere más tiempo.

(3) Para el tipo de adenovirus que es el más ampliamente utilizado para generar adenovirus recombinantes, es decir, adenovirus serotipo 5 humano, las etapas 1-8 del ciclo de vida, tal como se describe en los antecedentes de la invención, se completan en aproximadamente 2 días después de la entrada en la célula. Por el contrario, la inducción de la lisis en las etapas tardías de la infección se produce con velocidades diferentes, dependiendo del tipo de célula huésped, y puede durar hasta una semana.

(4) Por lo tanto, aumentando la capacidad lítica de un adenovirus recombinante debe tener un impacto importante en la duración del ciclo de vida del adenovirus recombinante.

(5) La velocidad a la que el adenovirus recombinante induce la lisis celular parece estar relacionada con el estado de p53 de la célula, en la que la deficiencia de p53 se correlaciona con una lisis retardada.

(6) Muchas, si no todas, las células hiperproliferativas incluyendo las células cancerígenas y líneas celulares inmortalizadas portan una o más lesiones en la vía de apoptosis dependiente de p53.

(7) Por lo tanto, debería ser posible aumentar la velocidad a la que el adenovirus recombinante induce la lisis celular y completa su ciclo de vida en una célula huésped, mediante la restauración de una vía de apoptosis dependiente de p53 funcional en la célula huésped durante la replicación del adenovirus recombinante.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un virus recombinante competente para la replicación, capaz de replicarse y tener capacidad lítica en células diana, siendo dichas células defectuosas en la vía de apoptosis dependiente de p53, siendo el virus un adenovirus condicionalmente de replicación y que comprende en el genoma del mismo la secuencia que codifica una proteína de la vía de apoptosis dependiente de p53, unida funcionalmente a una o más secuencias de control de la expresión, funcional en dichas células diana, y que comprende además en el genoma del mismo el gen que codifica la proteína E1B-55kDa del adenovirus o un derivado funcional de la misma, capaz de interactuar con p53.

Por lo tanto, los adenovirus recombinantes, según la presente invención, son capaces de replicarse en una célula huésped y de expresar un factor funcional de la vía de apoptosis dependiente de p53. La función de dicho factor no es o es insuficientemente expresada por las células diana y, por lo tanto, dicho factor es referido como factor de restauración. El factor de restauración preferentemente comprende una proteína. Ejemplos no limitativos de dicho factor de restauración son la proteína p53, la proteína BAX y miembros de la familia de los mismos. Tal como se señaló anteriormente, se debe entender claramente que los términos "competente para la replicación" y "es capaz de replicarse en una célula huésped" se refieren a que dichos adenovirus recombinantes por sí 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 necesidad de proporcionar ninguna de las funciones codificada por cualquiera de las partes eliminadas del genoma de dichos adenovirus recombinantes por otros medios, tal como la provisión de los mismos en el genoma de la célula huésped. Dicho adenovirus recombinante es un adenovirus competente para la replicación, preferentemente un adenovirus condicionalmente de replicación o un adenovirus heterológamente transcomplementado. Dichos adenovirus recombinantes no son adenovirus deficientes de replicación. Es más preferente que dicho factor de restauración sea una proteína de mamífero, por ejemplo una proteína humana.

El término "factor de restauración" se refiere a que dicho factor comprende, como mínimo, una actividad de la contraparte natural (es decir, no modificado) de dicho factor, estando dicha actividad ausente o insuficiente en la célula diana, en la que "actividad" se refiere, como mínimo, en la naturaleza. También es preferente que la actividad sea, como mínimo, igual que la de la contraparte natural en cantidad, pero es preferente que sea incluso mayor. Por lo tanto, el término "factor de restauración" incluye un factor no modificado y todos sus derivados sintéticos o naturales que comparten, como mínimo, una actividad con dicho factor no modificado. El término "factor" comprende proteína, el término proteína se refiere a que incluye péptidos o fragmentos funcionales de proteínas o péptidos.

La presente invención también está basada en la comprensión de que es importante mantener la capacidad de un adenovirus para contrarrestar la apoptosis de la célula huésped, como mínimo en parte, con el fin de evitar la muerte celular prematura antes de que se complete la replicación del adenovirus. Por lo tanto, preferentemente los adenovirus recombinantes de la presente invención retienen uno o más genes que codifican proteínas capaces de regular la apoptosis de la célula huésped, en particular genes de las regiones E1B y E4. Preferentemente, un gen que codifica la proteína E1B-55kDa o un análogo o derivado funcional de la misma, está presente en el genoma del adenovirus recombinante de la presente invención, como se mostrará en el ejemplo 7 más adelante. En este sentido, los adenovirus recombinantes de la presente invención son esencialmente diferentes de los que se describen en los documentos WO 00/29573 y WO 01/74403, que carecen de un gen de E1B-55kDa funcional y, por lo tanto, no muestran las características útiles de los adenovirus recombinantes de la presente invención.

Más preferentemente, la región E1B completa está presente en el genoma del virus recombinante de la presente invención, es decir, incluyendo secuencias de codificación de la proteína E1B-19kDa. Además, es preferente que también el gen que codifica E4orf6, o un análogo o derivado funcional de la misma, esté presente en el genoma del adenovirus recombinante de la presente invención,

5 La presente invención también da a conocer formulaciones que comprenden los adenovirus recombinantes, según la presente invención, que se pueden utilizar para preservar dichos adenovirus recombinantes y administrar dichos adenovirus recombinantes a las células. En una variante, las formulaciones se utilizan para administrar dichos adenovirus recombinantes a células *in vitro*, en otra realización, las formulaciones se utilizan para administrar dichos adenovirus recombinantes a las células *in vivo*.

La presente invención da a conocer además métodos para administrar las formulaciones según la presente invención a las células, lo que lleva a la infección de dichas células con los adenovirus recombinantes de la presente invención. En una realización, los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a células *in vitro*, en otra variante, los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a las células *in vivo*.

10 La presente invención también da a conocer composiciones de los adenovirus recombinantes, según la presente invención, y células en las que los adenovirus recombinantes, según la presente invención, inducen lisis celular acelerada y/o una liberación más rápida de la progenie del virus, en comparación con adenovirus recombinantes que carecen de secuencias codificadoras del factor de restauración, según la presente invención. En una realización preferente de la presente invención, dichas células son células cancerosas y dicha lisis celular es oncolisis. En una  
15 variante adicional preferida de la invención, dichas células son células humanas.

En otro ejemplo, la presente invención da a conocer composiciones de los adenovirus recombinantes, según la presente invención, y los tumores en los que los adenovirus recombinantes, según la presente invención, inducen lisis celular acelerada y/o una liberación más rápida de la progenie del virus, en comparación con adenovirus recombinantes que carecen de secuencias codificadoras del factor de restauración, según la presente invención. En  
20 este aspecto de la presente invención, es preferente que dicha lisis celular acelerada y/o liberación más rápida de la progenie de virus resulte en una propagación lateral acelerada de dicho adenovirus recombinantes de las células infectadas a células vecinas en dicho tumor, en comparación con adenovirus recombinantes que carecen de secuencias codificadoras del factor de restauración según la presente invención. En este aspecto de la presente invención, es más preferente que dicha lisis celular acelerada, liberación más rápida de la progenie de virus y/o  
25 propagación lateral acelerada conlleven a una destrucción más eficaz o inhibición del crecimiento de dicho tumor. En una realización preferente de la presente invención, dicho tumor crece en un cuerpo animal. En una realización adicional, dicho cuerpo animal es un cuerpo humano.

La presente invención también da a conocer métodos para construir los adenovirus recombinantes, según la presente invención, y para preparar las formulaciones y composiciones, según la presente invención.

30 La presente invención contempla, además, la utilización de los adenovirus recombinantes, métodos y formulaciones, según la presente invención, para el tratamiento de una enfermedad que implica la supervivencia celular no adecuada, 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 cáncer.

35 En lo sucesivo, en varias realizaciones de la presente invención, se muestran varias formas de proporcionar dichos adenovirus recombinantes, formulaciones, métodos, composiciones y usos

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención y realizaciones preferentes se muestran en las reivindicaciones más adelante. En una realización, la presente invención da a conocer un adenovirus recombinante competente para la replicación, capaz de replicarse en una célula huésped, siendo dicha célula huésped defectuosa en la vía dependiente de p53, es decir,  
40 que ha perdido la capacidad de inducir apoptosis a través de la vía dependiente de p53, y en el que dicho virus comprende, como mínimo, un marco abierto de lectura para un factor de restauración, en particular una proteína, capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 en dichas células diana, estando dicho marco abierto de lectura funcionalmente unido con secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicho factor se expresa en dicha célula huésped en la que se introduce dicho adenovirus recombinante. En una realización, se da a conocer un  
45 adenovirus recombinante que comprende uno o más marcos abiertos de lectura para una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 funcionalmente unidos con secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicha proteína se expresa en una célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante; en el caso de múltiples marcos abiertos de lectura, como mínimo, dos de los mismos codifican cada uno para una proteína diferente capaz de inducir apoptosis dependiente de p53.

50 El virus se puede replicar en las células diana de varias maneras, tal como se discutió anteriormente; el experto en la materia será consciente de estrategias de replicación adecuadas.

El adenovirus recombinante es un adenovirus de replicación competente, tal como (1) un adenovirus condicionalmente de replicación, o (2) un adenovirus heterológamente transcomplementado, o (3) un adenovirus competente para la replicación de dos componentes heterológamente transcomplementado o un adenovirus  
55 condicionalmente de replicación que comprende como un primer componente un adenovirus recombinante que comprende, como mínimo, un marco abierto de lectura para una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 unido funcionalmente a secuencias de ADN reguladoras, de manera que dicha proteína se expresa en dicha célula huésped en la que se introduce el adenovirus recombinante y como un segundo componente un adenovirus



de replicación heterológamente transcomplementado o condicionalmente de replicación, en el que es preferente un adenovirus recombinante según las posibilidades 1 o 2. Ejemplos de adenovirus condicionalmente de replicación se derivan de adenovirus con expresión controlada, como mínimo, de un gen temprano esencial de adenovirus mediante un promotor específico de tumor, incluyendo los descritos por Rodríguez y otros (Cancer Res. 57 (1997): 2559-2563) y por Hallenbeck y otros (Hum. Gene Ther. 10 (1999): 1721-1733) o adenovirus con mutaciones en los genes virales para anular la interacción de las proteínas codificadas con las proteínas celulares, necesarias para completar el ciclo de vida viral en células normales, pero no en células tumorales, incluyendo 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): 485-494) y Fueyo y otros (Oncogene 19(2000): 2-12), o adenovirus que comprenden ambos tipos de modificaciones. Un ejemplo no limitativo de un adenovirus heterológamente transcomplementado se deriva de un adenovirus recombinante con una región E1 suprimida funcionalmente que expresa proteínas las proteínas E6 y E7 de VPH (Steinwaerder y otros, Mol. Ther. 4 (2001) :211-216). El término " apoptosis dependiente de p53" se refiere a la muerte celular que involucra una vía en la que la proteína p53 juega un papel. El conocimiento actual sobre la regulación de la muerte celular programada y la posición de p53 en las vías de apoptosis se revisa en: Zoernig y otros, Biochem. Biophys. Acta 1551 (2001): F1-F37, Moll y Zaika, FEBS Letters 493 (2001): 65-69. Se entiende que dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 incluye la propia proteína p53, así como sus homólogos, incluyendo sin constituir limitación, a p63 y p73 y cualquier otro miembro de proteína actualmente conocidas o aún a ser identificadas de la vía de apoptosis dependiente de p53, incluyendo BAX, BAK, BOK/Mtd, BCL-X<sub>s</sub>, Noxa/APR, PIDD, p53AIP1, PUMA, KILLER/DR5, Apaf-1 y los productos PIG (Miyashita y Reed, Cell 80 (1995): 293-299; Kiefer y otros, Nature 374 (1995): 736-739; Minn y otros, J. Biol. Chem. 271 (1996) :6306-6312; Polyak y otros, Nature 389 (1997): 300-305;. Wu y otros, Nature Genet.17 (1997): 141-143; Fearnhead y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998): 13664-13669; Juergensmeier y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998): 4997-5002; Soengas y otros, Science 284 (1999): 156-159; Oda y otros, Science 288 (2000): 1053-1058;. Oda y otros, Cell, 102 (2000): 849-862; Pearson y otros, Clin. Cancer Res. 6 (2000): 887-890; Lin y Benchimol, Nature Genet. 26 (2000): 122-127; Yu y otros, Mol. Celular 7 (2001): 673-682). Se entiende que no es necesario que la expresión de dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 se regula directamente o indirectamente por transactivación de p53. Una proteína que es capaz de potenciar la vía de la apoptosis dependiente de p53 mediante la interacción con uno o más miembros de dicha vía es también considerada de por sí como un miembro de dicha vía. Ejemplos no limitativos de este tipo de proteínas capaces de inducir la apoptosis dependiente de p53 son BID y su forma truncada p15 (tBID) que activa miembros de la familia de bcl-2 proapoptóticos, tales como BAX y BAK (Desagher y otros, J. Cell Biol. 144 (1999) :891-901; Wei y otros, Genes Dev. 14 (2000): 2060-2071;. Wei y otros, Science 292 (2001): 727-730), y moléculas, tales como BAD, HRK, Bik/Nbk y Blk que inducen la apoptosis mediante el antagonismo de los miembros de la familia de bcl-2 que promueven la supervivencia (Boyd y otros, Oncogene 11 (1995): 1921-1928;. Han y otros, Mol. Cell Biol. 16 (1996) :5857-5864; Kelekar y otros, Mol. Cell Biol. 17 (1997): 7040-7046; Inohara y otros, EMBO J. 16 (1997): 1686-1694; Hegde y otros, J. Biol. Chem. 273 (1998) :7783-7786). Dicha proteína también incluye moléculas capaces de aumentar la cantidad de p53 en células con p53 no modificadas o capaces de transactivar aguas abajo proteínas efectoras de p53. Ejemplos de proteínas capaces de aumentar la cantidad de p53 en células con p53 no modificadas son la proteína codificada por el gen 7 asociado a la diferenciación de melanoma (mda-7) (Jiang y otros, Oncogene 11 (1995): 2477-2486; Saeki y otros, Gene Ther 7 (2000): 2051-2057) y p14ARF en células deficientes de p14ARF. Aunque se ha descrito que mda-7 media en la apoptosis independiente de p53 (WO 97/30732), cumple con la definición de un miembro de la vía de apoptosis dependiente de p53, tal como se define en el presente documento. Dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53, además, incluye realizaciones funcionales, análogos o derivados de la misma, tales como proteínas y péptidos mutantes que conservan la capacidad de inducir apoptosis dependiente de p53. Los términos "realización", "análogo" o "derivado" en relación con las proteínas o péptidos descritos anteriormente incluyen cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazamiento, supresión o adición de uno (o más) aminoácidos o de la secuencia de codificación, con la condición de que la realización, análogo o derivado conserva la función similar en comparación con el péptido o proteína original, es decir, la capacidad de inducir apoptosis dependiente de p53. Dichos derivados entran dentro del alcance de la presente invención.

Un ejemplo de una proteína mutante que conserva la capacidad para inducir apoptosis dependiente de p53 es la mutante de p53 Q22/S23, que ha anulado la función de detención del crecimiento pero sólo ha atenuado la capacidad de inducción de apoptosis (Venot y otros, Oncogene 18 (1999) :2405-2410). Otros ejemplos de proteínas mutantes que conservan la capacidad de inducir apoptosis dependiente de p53 son las mutantes de p53 14/19, p53 (d13-19) y CTS1 (Lin y otros, Genes & Dev. 8(1994): 1235-1246; Kubbutat y otros, Nature 387 (1997): 299-303;. Bougeret y otros, Cancer. Gene Ther. 7 (2000) :789-798). Estos últimos mutantes no tienen el dominio de unión a la proteína MDM2 y muestran una actividad de apoptosis mejorada en células cancerosas que expresan p53 no modificada (Bougeret y otros, Cancer Gene Ther. 7 (2000) :789-798; Atencio y otros, Mol. Ther. 4 (2001): 5-12); Lu y otros, Cancer Res. 62 (2002): 1305-1310. Se entiende que el término "proteína MDM2" se utiliza como término general para referirse a todos los homólogos de esta proteína de especies diferentes, incluyendo la proteína MDM2 humana que a menudo es referida como "proteína MDM2". Otro ejemplo de una proteína mutante que conserva la capacidad para inducir apoptosis dependiente de p53 es una proteína de fusión de p53 con un péptido líder de importación mitocondrial (Marchenko y col., J. Biol. Chem. 275 (2000): 16202-16212). Un ejemplo de un péptido que conserva la capacidad para inducir apoptosis dependiente de p53 es un fragmento de aminoácidos que incluye la región-3 de homología a Bcl-2 (BH3) de BAK (Chittenden y otros, Nature 374 (1995): 733-736; Cosulich y otros, Curr. Biol. 7 (1997): 913-920; Holinger y otros, J. Biol. Chem. 274 (1999) :13298-13304). Otro ejemplo de un péptido

que conserva la capacidad para inducir apoptosis dependiente de p53 es la forma troncada de 18 kDa de BAX con actividad de muerte celular mejorada (Wood y Newcomb, Exp. Cell Res. 256 (2000): 375-382; Gao y Dou, J. Cell. Biochem. 80(2000): 53-72). Es preferente que dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 sea una proteína de mamífero, por ejemplo una proteína humana, o una variante funcional, análogo o derivado de la misma. Además, es preferente que dicha proteína pueda interactuar y ser antagonizada, como mínimo, una de las proteínas E1B y/o E4 del adenovirus. Por ejemplo, si dicha proteína es p53, o una variante funcional, análogo o derivado de la misma, es preferente que dicha proteína pueda interactuar con las proteínas E1B-55kDa y/o E4orf6 del adenovirus. Entre los aminoácidos en la proteína p53 que se requieren para la interacción con la proteína E1B-55kDa del adenovirus se incluyen Trp-23, Lys-24 y Pro-27 (Lin y otros, Genes & Dev. 8 (1994): 1235-1246). Por lo tanto, si se utiliza una variante funcional, análogo o derivado de p53, es preferente que dicha variante funcional análogo o derivado comprenda los aminoácidos Trp-23, Lys-24 y Pro-27 de p53.

Se entiende que "inducir la apoptosis dependiente de p53" se refiere a la estimulación activa de la vía apoptosis dependiente de p53, así como la restauración de la capacidad de una célula para responder a una pérdida del punto de control del ciclo celular, experimentando una apoptosis dependiente de p53. Además, se entiende que "interaccionar con", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la formación de un complejo físico entre una proteína o péptido con una proteína o péptido contraparte, así como a la regulación mediante dicha proteína o péptido de la actividad de dicha proteína o péptido contraparte sin la formación directa del complejo.

En una realización, el adenovirus recombinante se caracteriza porque dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 es la proteína p53 humana.

En una realización preferente, el adenovirus recombinante se caracteriza además porque comprende, como mínimo, uno de los genes de la región E1B, o un análogo o derivado funcional del mismo. En una realización, dicho adenovirus recombinante comprende la región E1B completa. En una segunda realización, dicho adenovirus recombinante comprende unidades funcionales de expresión para las proteínas E1B-19kDa y E1B-55kDa, o análogos o derivados funcionales de las mismas. En una tercera realización, dicho adenovirus recombinante comprende una unidad de expresión funcional de la proteína E1B-55kDa, o un análogo o derivado funcional de la misma. Se entiende que entre los análogos funcionales de E1B-55kDa se incluyen proteínas de otros virus que son capaces de interactuar con p53, incluyendo sin constituir limitación, la proteína E6 de HPV y el antígeno nuclear asociado a latencia del herpesvirus-8 y derivados funcionales de los mismos. Además, se entiende que entre los análogos funcionales de E1B-19kDa se incluyen miembros antiapoptóticos de la familia bcl-2 de proteínas y derivados funcionales de los mismos. Es preferente que las proteínas codificadas por dichos genes de la región E1B o sus análogos funcionales o derivados son capaces de interactuar con la proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53, o con una proteína efectora aguas abajo de la misma.

En una realización, el adenovirus recombinante también se caracteriza porque comprende, como mínimo, uno de los genes de la región E3. En una realización, dicho adenovirus recombinante comprende la región E3 completa. En una segunda realización, dicho adenovirus recombinante comprende unidades funcionales de expresión para una o más de las proteínas codificadas por la región E3, tal como por ejemplo E3-ADP.

En otra realización, el adenovirus recombinante se caracteriza además porque carece de la región E3 funcional. Tal como se muestra en los ejemplos, el adenovirus recombinante no requiere de una región E3 para la replicación eficaz y lisis de una célula huésped. Además, se muestra en el ejemplo 9 que un adenovirus condicionalmente de replicación conserva sus propiedades de replicación condicional.

En otra realización preferente, el adenovirus recombinante se caracteriza además porque comprende el gen E4orf6, o un análogo o derivado funcional del mismo. Es preferente que las proteínas codificadas por dicho gen E4orf6, o un análogo o derivado funcional del mismo, sea capaz de interactuar con la proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53, o con una proteína efectora aguas abajo de la misma, o de interactuar con una segunda proteína codificada por dicho adenovirus recombinante que es capaz de interactuar con la proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53, o con una proteína efectora aguas abajo de la misma. Un ejemplo de dicha segunda proteína es la proteína E1B-55kDa o un análogo o derivado funcional de la misma.

Las secuencias de control unidas funcionalmente a las secuencias, es decir, el marco abierto de lectura, que codifica la proteína o péptido de interés, incluyen promotores/potenciadores y otras señales reguladoras de la expresión. Estas secuencias de control se pueden seleccionar para ser compatibles con la célula huésped para la cual se diseña el vector de expresión que se utilizará. El término promotor es bien conocido en la técnica y abarca regiones de ácidos nucleicos que varían en tamaño y complejidad, de promotores mínimos a promotores que incluyen elementos aguas arriba y potenciadores. Habitualmente, el promotor se selecciona a partir de promotores que son funcionales en células de mamíferos, aunque se pueden utilizar promotores funcionales en otras células eucariotas. Habitualmente, el promotor se deriva de secuencias promotoras de genes virales o eucarióticos. Por ejemplo, puede ser un promotor derivado del genoma del tipo de célula en la que se produce la expresión. Con respecto a los promotores eucarióticos, pueden ser promotores que funcionan en una manera ubicua (tales como promotores de un-actina, b-actina, tubulina) o, alternativamente, de manera específica de un tejido (tal como promotores de los genes que codifican la piruvato quinasa).

En una realización, dicho marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir la apoptosis dependiente de p53 está funcionalmente unido con secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicha proteína se expresa constitutivamente en una célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante. En este caso, la expresión de dicha proteína es controlada por un promotor constitutivo o estable. La presente invención no impone la elección de dicho promotor estable. El tipo de promotor se selecciona para lograr un perfil de expresión útil para dicha proteína en el contexto de dicho adenovirus recombinante. Entre los ejemplos de promotores útiles para esta realización de la presente invención se incluyen el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el promotor temprano inmediato Simian Virus 40 (SV40) y promotores de los genes eucariotas.

En otra realización, dicho marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 está funcionalmente unido a una o más secuencias de control, es decir, secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicha proteína sólo se expresa o se expresa a un nivel más alto en una célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante bajo ciertas condiciones que pueden ser modulados por una señal externa, en el que el término "externo" se refiere a que tiene su origen fuera del fragmento de ADN que comprende dicho marco abierto de lectura y dichas secuencias de ADN reguladoras. En este aspecto, la expresión de dicha proteína es controlada por un promotor llamado regulable o inducible. Entre los ejemplos de dicha señal externa se incluyen, sin constituir limitación, la adición o la privación de un compuesto químico, un cambio en la temperatura, una disminución de la concentración de oxígeno, irradiación, y similares. Entre los ejemplos de este tipo de promotores se incluyen el promotor de la proteína de choque térmico 70, el promotor de un gen de proteínas de fase aguda, tal como el gen amiloide A3 de suero o el gen del factor 3 del complemento, el promotor de la proteína de respuesta temprana del crecimiento, el promotor del gen de resistencia a multimedicamentos 1 y los promotores que comprenden uno o más elementos de respuesta a hipoxia y fragmentos de los mismos (Kohn y otros, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 165 (1989): 1415-1421; Varley y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995): 5346-5350; Hallahan y otros, *Nature Med.* 1 (1995): 786-791; Dachs y otros, *Nature Med.* 3 (1997): 515-520; Blackburn y otros, *Cancer Res.* 58 (1998): 1358-1362; Binley y otros, *Gene Ther.* 6 (1999): 1721-1727; Marples y otros, *Gene Ther.* 7 (2000): 511-517). Una clase especial de promotor regulable es un promotor específico del tipo de tejido o células, en el que dicha señal externa es proporcionada por una proteína que sólo está presente en un tipo particular de célula o tejido. Entre los ejemplos no limitativos de promotores específicas del tipo de tejido o célula se encuentran el promotor antígeno específico de próstata, el promotor de alfa-fetoproteína, el promotor de la albúmina, el promotor del antígeno carcinoembrionario, el promotor del gen de citoqueratina 18, el promotor de la calicreína 2, el promotor de la tirosinasa, el promotor de la osteocalcina, el promotor PAX-5 y el promotor de alfa-lactoalbúmina (Kaneko y otros, *Cancer Res.* 55 (1995): 5283-5287; Richards y otros, *Hum. Gene Ther.* 6 (1995): 881-893; Kozmik y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995): 5709-5713; Siders y otros, *Cancer Res.* 56 (1996): 5638-5646; Chow y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997): 14695-14700; Shirakawa y otros, *Cancer Gene Ther.* 5 (1998): 274-280; Gotoh y otros, *J. Urol.* 160 (1998): 220-229; Anderson y otros, *Gene Ther.* 6 (1999): 854-864; Yu y otros, *Cancer Res.* 59 (1999): 4200-4203). Otro tipo especial de promotor regulable es un promotor que es sensible a una señal externa que es proporcionada por una proteína que no está presente en un tipo particular de célula o tejido. En particular, las señales externas que están ausentes en el tejido hepático son de interés en el contexto de la administración in vivo de adenovirus recombinantes. Entre los ejemplos no limitativos de promotores que son sensibles a señales externas que están ausentes en el tejido hepático son el promotor de la ciclooxigenasa-2 y el promotor de "midkine" (Adachi y otros, *Cancer Res.* 60 (2000): 4305-4310; Yamamoto y otros, *Mol. Ther.* 3 (2001): 385-394). Otro tipo especial de promotor regulable es un promotor que es sensible a una señal externa que es proporcionada por una proteína que sólo está presente durante una determinada etapa del ciclo celular. Un ejemplo de este tipo de promotor es el promotor de un gen que es sensible a E2F, tal como por ejemplo el gen E2 de adenovirus o el gen E2F-1. Otro tipo especial de promotor regulable, que no son mutuamente excluyentes, es un promotor denominado elemento de respuesta a la transactivación (TRE). Dicho TRE es un primer componente de un sistema de transactivación que comprende como un segundo componente una proteína transactivadora, que es capaz de unirse con especificidad a dicho TRE, regulando así la transcripción de un gen unido a dicho TRE.

En otra realización de la presente invención, dicho marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 está funcionalmente relacionada con secuencias de ADN reguladoras, de tal manera que dicha proteína sólo se expresa en una célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante durante la fase tardía de la replicación del adenovirus. La expresión de dicha proteína que limita la fase tardía de la replicación del adenovirus es de interés particular en el contexto de un CRAd. Dado que dicha replicación sólo se produce en células en las que existen ciertas condiciones que son aprovechadas por dicho CRAd para permitir dicha replicación, expresión de dicha proteína, también limitará dichas células en las que existen dichas determinadas condiciones. Esta realización de la presente invención, por lo tanto, se adicionará a la especificidad de dicho CRAd. En este aspecto de la presente invención, es preferente que la expresión de dicha proteína esté controlada por el promotor tardío principal de adenovirus (MLP). En los adenovirus recombinantes en los que el MLP controla la expresión de dicho marco abierto de lectura es preferente que el casete de expresión para dicho marco abierto de lectura comprenda las secuencias de acción *in cis* necesarias para conferir plena actividad transcripcional de MLP durante la fase tardía de la replicación del adenovirus, tal como se define por Mondesart y otros (*Nucleic Acids Res.* 19 (1991): 3221-3228), incluido como referencia en el presente documento. Un casete de expresión útil para este aspecto de la presente invención se describe en el documento US5518913. De forma alternativa, dicho marco abierto de lectura está relacionado funcionalmente con el MLP endógeno.

La presente invención no impone el sitio de inserción de dicho marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 funcionalmente relacionada con secuencias de ADN reguladoras en el genoma de dicho adenovirus recombinante; dicha inserción puede estar en cualquier lugar en dicho genoma que no inhibe la replicación de dicho adenovirus recombinante en dicha célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante y en la que los casetes de expresión endógenos en dicho genoma no interfieren con la expresión adecuada de dicho marco abierto de lectura. En los ejemplos, dicha inserción es un reemplazo de la región E3 del adenovirus o inserción entre el promotor E4 y la parte a la derecha del ITR. Son conocidas en la técnica construcciones de ADN para generar adenovirus recombinante con inserciones en la región E3, incluyendo sin constituir limitación, pBHG10 y pBHG11 (Bett y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994): 8802-8806), y se pueden hacer inserciones en otros sitios dentro del genoma del adenovirus utilizando métodos estándar de biología molecular conocidos en la técnica. En situaciones específicas, es preferente para la expresión adecuada de dicho marco abierto de lectura blindar dicho marco abierto de lectura para una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 funcionalmente relacionada con secuencias de ADN reguladoras de otras secuencias de ADN reguladoras presentes en dicho genoma del adenovirus mediante el flanqueo de dicho marco abierto de lectura para una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 funcionalmente relacionada con secuencias de ADN reguladoras mediante elementos denominados aisladores (Steinwaerder y Lieber, Gene Therapy 7 (2000): 556-567. En otra realización, dicho marco abierto de lectura 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 la que además es preferente que dicho gen de adenovirus esté funcionalmente relacionado con MLP endógeno.

En una realización, el adenovirus recombinante está caracterizado porque: (1) dicho marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 está funcionalmente relacionada con secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicha proteína se expresa constitutivamente en una célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante, (2) dicho adenovirus recombinante comprende, como mínimo, una de las proteínas de la región E1B (o análogos o derivados funcionales de las mismas), pero preferentemente una región E1B intacta, y también comprende preferentemente, como mínimo, un gen que codifica, como mínimo, una de las proteínas de la región E4 (o análogos o derivados funcionales de las mismas), pero preferentemente una región E4 intacta, y (3) dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 o una proteína efectora aguas abajo directa o indirecta de dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 en la vía de apoptosis dependiente de p53 puede interactuar y ser antagonizada, como mínimo, por una de las proteínas de la región E1B y/o la región E4 incluidas en dicho adenovirus recombinante.

En otra realización, el adenovirus recombinante está caracterizado porque: (1) dicho marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 está funcionalmente relacionada con secuencias de ADN reguladoras de tal manera que dicha proteína se expresa constitutivamente en una célula en la que se introduce dicho adenovirus recombinante, (2) dicho adenovirus recombinante comprende, como mínimo, secuencias de codificación para las proteínas E1B-55kDa y E4orf6, o análogos o derivados funcionales de las mismas, y (3) dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 o una proteína efectora aguas abajo directa o indirecta de dicha proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 en la vía de apoptosis dependiente de p53 puede interactuar y ser antagonizada, como mínimo, por una de las proteínas de la región E1B y/o la región E4 incluidas en dicho adenovirus recombinante.

Los adenovirus recombinantes se preparan utilizando métodos de biología molecular, virología y biología celular conocidos en la técnica. Una manera de preparar los adenovirus recombinantes se describe con detalle en la sección de ejemplos.

La presente invención también da a conocer formulaciones que comprenden los adenovirus recombinantes que se pueden utilizar para preservar dichos adenovirus recombinantes y para administrar dichos adenovirus recombinantes a las células. Preferentemente, dichas formulaciones comprenden dicho adenovirus recombinante y un diluyente. Dicho diluyente permite el almacenamiento de dicho adenovirus recombinante durante un tiempo prolongado y/o la administración de dicho adenovirus recombinante a células en cultivo y/o a células en un cuerpo animal, en la que es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. Es preferente que dicho diluyente permita el almacenamiento bajo condiciones liofilizadas. También es preferente que dicho diluyente permita tanto el almacenamiento y como la administración de dicho adenovirus recombinante a células en cultivo y/o a células en un cuerpo animal. Se entiende que "permitir el almacenamiento" se refiere a que durante el almacenamiento de dicha formulación se conserva la capacidad de dicho adenovirus recombinante para infectar una célula con una vida media mayor de una semana, en el que es preferente que dicha vida media sea más de un mes, y en el que es lo más preferente que dicha vida media sea más 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 menos 60°C. Se entiende que dicha administración a células en cultivo y/o a células en un cuerpo animal se refiere a que dicha formulación y dichas células se ponen en contacto resultado en la introducción de dicho adenovirus recombinante en dichas células. Es preferente que dicho diluyente no sea tóxico para dichas células y para dicho cuerpo animal. La presente invención no impone la composición exacta de dicho diluyente, pero son conocidos en la técnica varios diluyentes útiles para el propósito de la presente invención. Entre los ejemplos de diluyentes se incluyen soluciones tampón a base de fosfato, tales como PBS o Tris o HEPES a una concentración entre 10 y 25 mM y con un pH entre 7,0 y 8,0, que contienen hasta 150 mM de NaCl o una combinación de NaCl y KCl, y entre 1 y 10 mM de MgCl<sub>2</sub> o una combinación de MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>, con un máximo hasta un 3% de sacarosa o

de hasta un 40% de glicerol. Otros ejemplos de diluyentes incluyen los medios de cultivo estándares para dichas células conocidos en la técnica, tales como por ejemplo DMEM, IMDM o RPMI-1640, opcionalmente complementados con suero animal o componentes de suero o proteínas séricas recombinantes, medio de cultivo químicamente definido, incluyendo medios libres de proteínas y diluyentes farmacéuticos conocidos en la técnica para la administración de medicamentos en un cuerpo animal, tal como por ejemplo Haemacel (Behring Pharma). Opcionalmente, dicho diluyente puede estar aún más suplementado con componentes adicionales para aumentar la estabilidad física de dichos adenovirus recombinantes durante el almacenamiento o para aumentar dicha introducción en dichas células. Dichos componentes pueden ser diferentes para cada uso específico de dicha formulación. Entre los ejemplos de dichos componentes adicionales se encuentran policationes (Arcasoy y otros, Gene Ther. 4 (1997): 32-38; Kaplan y otros, Hum. Gene Ther. 9 (1998): 1469-1479; Lanuti y otros, Gene Ther. 6 (1999): 1600-1610), polímeros policationicos y lípidos catiónicos (Fasbender y otros, J. Biol. Chem. 272 (1997): 6479-6489, Qiu y otros, Hum. Gene Ther. 9 (1998): 507-520), compuestos de poliamida (Connor y otros, Gene Ther. 8 (2001): 41-48), y los ingredientes divulgados por Croyle y otros (Mol. Ther. 4 (2001): 22-28). Opcionalmente, dicho diluyente puede estar aún más suplementado con componentes adicionales para mejorar la administración de dicho adenovirus recombinante en dichas células en un cuerpo animal. Entre los ejemplos de dichos componentes se encuentran los compuestos que aumentan la permeabilidad de las capas celulares en la pared de un vaso sanguíneo, tal como por ejemplo la bradiquinina, la serotonina y RMP-7 (Donahue y col., Gene Ther. 5 (1998) :630-634; Rainov y otros, Hum. Gene Ther. 10 (1999): 311-318), compuestos que protegen dicho adenovirus recombinante de una respuesta inmune contra dicho adenovirus recombinantes, tales como por ejemplo una capa protectora de liposomas tal como se describe en el documento WO 97/30732, o proteasas que son activas contra proteínas de la matriz extracelular (Kuriyama y otros, Cancer Res. 61 (2001): 1805-1809), tal como por ejemplo, colagenasas, gelatinasas, matrilisina, estromelisininas, dispasa, tripsina, neuraminidasa, serina proteasas y similares. Si dichas células en un cuerpo animal son células cancerosas en un tumor sólido, entonces es preferente que dichas proteasas sean activas contra proteínas de la matriz extracelular que están presentes en dicho tumor más abundantemente que en otras partes en dicho cuerpo animal, o que dicha proteasa sea activada por proteínas que están presentes más abundantemente en dicho tumor que en otras partes de dicho cuerpo animal. Entre los ejemplos de dichas proteínas que están presentes más abundantemente en dicho tumor que en otras partes de dicho cuerpo animal y que son capaces de activar dichas proteasas son metaloproteasas de tipo de membrana (MT-MMP) (Seiki, A.P.M.I.S. 107 (1999): 137 -143). Parte de los diluyentes y componentes adicionales que se describen en el presente documento se han utilizado en combinación con otros adenovirus recombinantes diferentes a los adenovirus recombinantes según la presente invención, pero aún no en los adenovirus recombinantes según la presente invención. El experto en la materia será capaz de definir mediante investigación adecuada los diluyentes útiles para preparar una formulación que resulte en la introducción de dicho adenovirus recombinante en células para cada uso particular y para cada método de administración particular.

La presente invención da a conocer además métodos para administrar las formulaciones a células, lo que lleva a la introducción de los adenovirus recombinante en dichas células. En una realización, los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a células *in vitro*, en otra realización, los métodos se utilizan para administrar dichas formulaciones a células *in vivo*. Los métodos no difieren en modo alguno de los conocidos en la técnica para administrar otros adenovirus recombinante a células. En general, los adenovirus recombinantes se diluyen hasta alcanzar una concentración útil en un diluyente.

En general, dicho diluyente es isotónico en relación con las condiciones en un cuerpo animal, pero en algunos casos puede ser deseable utilizar un diluyente a una concentración no isotónica. Dichos MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, sacarosa y glicerol no se requieren, y en el caso de la administración *in vivo*, es preferente que la concentración de glicerol sea tan baja como sea posible. Dicha concentración útil de dicho adenovirus recombinante será diferente para cada uso diferente. Un experto en la materia será capaz de determinar dicha concentración útil mediante experimentación. Dicha formulación se pone en contacto con dichas células, ya sea bajo condiciones estáticas, tales como en el caso de la administración a células en cultivo o en el caso de inyección en un tejido animal, o bajo condiciones dinámicas, tales como en el caso de 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 ponen en contacto a la temperatura existente en dicho cuerpo animal. En una realización, dicha administración se lleva a cabo a presión atmosférica. En otra realización, dicha administración se lleva a cabo a una presión superior a la presión atmosférica. Dicho contacto se mantiene durante un período de tiempo suficientemente largo para permitir la introducción de dicho adenovirus recombinante en dichas células.

La presente invención también da a conocer composiciones de un adenovirus recombinante que comprende, como mínimo, un marco abierto de lectura que codifica una proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 y células en las que se replica dicho adenovirus recombinante. Dicho adenovirus recombinante tiene una gama de huéspedes que permite la replicación en dichas células. Dicha composición resulta, como mínimo, en una de las dos situaciones siguientes, es decir, (1) dichas células son lisadas con mayor rapidez que cuando dichas células se combinan con un adenovirus recombinante que no sea el adenovirus recombinante según la presente invención, y/o (2) la progenie del virus de dicho adenovirus recombinante se libera más rápidamente de dicha célula que la progenie del virus de un adenovirus recombinante que no sea el adenovirus recombinante según la presente invención liberado de dicha célula, en la que es preferente que dicha composición resulte en ambas situaciones. En

una realización preferente, dichas células son células que han perdido la capacidad de responder a una pérdida del punto de control del ciclo celular experimentando apoptosis dependiente de p53. En ejemplos particulares de esta realización, dichas células son células de artritis reumatoide o células cancerosas. Para los fines de la presente invención, los términos "células cancerosas" y "células tumorales" se refieren a células que han perdido el control adecuado del crecimiento celular, dando lugar a un crecimiento y/o replicación no controlados de dichas células, por ejemplo, un cuerpo de mamífero, o a crecimiento/replicación acelerados o inmortalidad *in vitro*. Por lo tanto, el término se refiere a células cancerígenas malignas, premalignas y benignas. En una realización preferente, dichas células son células en un cuerpo animal, en la que es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. Las composiciones se obtienen mediante la administración de una formulación que comprende un adenovirus recombinante a dichas células mediante un método de acuerdo con la presente invención.

En una realización, dichas células que forman parte de una composición, son células en un tumor sólido. En una variación de esta realización, dicho tumor se mantiene en cultivo *in vitro*. En esta variación, dicho tumor puede ser artificialmente derivado de células de cáncer, tales como por ejemplo esferoides derivados de una línea celular, o dicho tumor puede ser derivado de un explante de un tumor en un cuerpo animal. En otra realización, dicho tumor está presente en un cuerpo animal. En esta realización, dicho tumor puede ser implantado quirúrgicamente en dicho cuerpo animal o dicho tumor puede haber surgido de dicho cuerpo animal. En este último caso, es preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. En esta realización, es preferente que la lisis celular más rápida y/o una liberación más rápida de los virus de la progenie de lugar a una propagación lateral acelerada de dicho adenovirus recombinante de las células infectadas a células vecinas en dicho tumor, en comparación con adenovirus recombinantes que carecen de la proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53. En este aspecto, es preferente además que dicha lisis celular más rápida, liberación más rápida de la progenie de virus y/o propagación lateral acelerada den lugar a una destrucción más eficaz o la inhibición del crecimiento de dicho tumor.

En otra realización, dichas células que forman parte de una composición, son células sinoviales reumatoides. En una variación de esta realización, dichas células sinoviales reumatoides se mantienen en cultivo *in vitro*. En otra realización, dichas células sinoviales reumatoides están presentes en un cuerpo animal, en la que dichas células sinoviales reumatoides están presentes en una articulación inflamada de forma crónica y en la que es más preferente que dicho cuerpo animal sea un cuerpo humano. En esta realización, es preferente que la lisis celular más rápida y/o una liberación más rápida de los virus de la progenie de lugar a una propagación lateral acelerada de dicho adenovirus recombinante de las células infectadas a células vecinas en dicha articulación inflamada, en comparación con adenovirus recombinantes que carecen de la proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53. En este aspecto, es preferente además que dicha lisis celular más rápida, liberación más rápida de la progenie de virus y/o propagación lateral acelerada den lugar a una destrucción más eficaz o la inhibición del crecimiento de dichas células sinoviales reumatoides.

En otra realización adicional, dichas células que forman parte de una composición, son células vasculares de músculo liso. En una variación de esta realización, dichas células vasculares de músculo liso se mantienen en cultivo *in vitro*. En otra realización, dichas células vasculares de músculo liso están presentes en un cuerpo animal, en la que es preferente que dichas células vasculares de músculo liso estén presentes en un área de hiperplasia íntima, tal como por ejemplo, en arterioesclerosis, restenosis o oclusión de injerto vascular y en la que más preferentemente dicho cuerpo animal es un cuerpo humano. En esta realización, es preferente que la lisis celular más rápida y/o una liberación más rápida de los virus de la progenie de lugar a una propagación lateral acelerada de dicho adenovirus recombinante de las células infectadas a células vecinas en dicha área de hiperplasia íntima, en comparación con adenovirus recombinantes que carecen de la proteína capaz de inducir apoptosis dependiente de p53. En este aspecto, es preferente además que dicha lisis celular más rápida, liberación más rápida de la progenie de virus y/o propagación lateral acelerada den lugar a una destrucción más eficaz o la inhibición del crecimiento de dichas células vasculares de músculo liso.

La presente invención se refiere además a la utilización de los adenovirus recombinantes, métodos y formulaciones para el tratamiento de una enfermedad que implica la supervivencia celular no adecuada, en la que es preferente que dicha enfermedad sea una enfermedad en un ser humano. Un tratamiento comprenderá la administración de un adenovirus recombinante, en una formulación, a las células enfermas en un cuerpo animal utilizando un método según la presente invención. En una realización particular, dicha enfermedad es cáncer y dichas células enfermas son células cancerosas, en la que es preferente que dichas células cancerosas sean parte de un tumor sólido o una metástasis tumoral. En dependencia del tipo de enfermedad y de la naturaleza de las células enfermas, se seleccionará un adenovirus recombinante útil, una formulación útil y una vía de administración útil. Con respecto a dicho adenovirus recombinante, una proteína útil capaz de inducir apoptosis dependiente de p53 puede seleccionarse en base a investigaciones previas, pero preferiblemente también en base al conocimiento de los antecedentes genéticos de dicha enfermedad en general, o más preferentemente de los antecedentes genéticos de dichas células enfermas, en particular. Una formulación y vía de administración útiles se seleccionarán 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 le administra dicha formulación. Entre los ejemplos de dicha vía de administración se incluyen la inyección directa en un tejido que contiene las células enfermas, la administración oral, la inyección en la circulación sanguínea, inhalación, inyección en una cavidad corporal, tales como la cavidad pleural y peritoneal, una articulación, o un ventrículo cerebral, inyección en el lumen de una parte del tracto gastrointestinal o urogenital y aplicación sobre la

superficie de un área determinada del cuerpo, tales como la piel o la mucosa otolaríngea, por ejemplo mediante un enjuague bucal. Si dicha vía de administración es mediante inyección en la circulación sanguínea, es preferente que dicha inyección se realice en una arteria que conduce a una parte de dicho cuerpo animal que contiene dichas células enfermas.

5 La presente invención además da a conocer que un tratamiento de una enfermedad se combina con otros métodos y medios para eliminar una población de células enfermas conocidos en la técnica, incluyendo sin constituir limitación, irradiación, introducción de genes que codifican proteínas tóxicas, tales como por ejemplo la toxina de la difteria o profármacos de conversión de enzimas tales como timidina quinasa, citosina desaminasa o carboxilesterasa, o citoquinas tales como interleuquina-2 o GM-CSF, o productos antiangiogénicos tales como endostatina o angioestatina y la administración de compuestos químicos, anticuerpos, antagonistas de receptores y similares. Se prevé que dicho tratamiento combinado puede dar lugar a una destrucción más eficaz de dicha población de células enfermas que con cualquier tratamiento solo. Además, un tratamiento puede potenciar el efecto de otro tratamiento. Por ejemplo, se conoce que la irradiación y determinados compuestos químicos inducen la vía de la apoptosis dependiente de p53. Por lo tanto, dichos tratamientos pueden potenciar la lisis celular eficiente y la liberación de virus de la progenie de un adenovirus recombinante.

En lo sucesivo, la presente invención será ejemplificada mediante los siguientes ejemplos y figuras. Los ejemplos muestran diferentes maneras de proporcionar dichos adenovirus recombinantes, formulaciones, métodos, composiciones y usos.

#### Descripción de las figuras

20 Figura 1. La destrucción de células cancerosas humanas por replicación del adenovirus recombinante es potenciada por la expresión de p53. Se infectaron cinco líneas celulares de cáncer humanas (tal como se indica en los paneles) con diferentes estados de p53 con AdGFP (círculos en blanco), Adp53 (círculos en negro), mezcla de dos virus AdE1+Luc/AdGFP (cuadrados en blanco), o mezcla de dos virus AdE1+Luc/Adp53 (cuadrados en negro) y se cultivaron hasta los 14 días. En varios puntos de tiempo, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de conversión WST-1 y se comparó con la viabilidad de cultivos de control no infectados. Los datos mostrados son los porcentajes promedio de células viables +/- desviaciones estándar de infecciones por triplicado.

Figura 2. La liberación de la progenie de adenovirus recombinantes de células cancerosas humanas infectadas es potenciada por la expresión de p53. Se infectaron cinco líneas celulares de cáncer humanas (tal como se indica en los paneles) con diferentes estados de p53 con mezcla de dos virus AdE1+Luc/AdGFP (círculos en blanco), o mezcla de dos virus AdE1+Luc/Adp53 (cuadrados en negro) y se cultivaron hasta los 14 días. En varios puntos de tiempo, se determinó el título de virus AdE1+Luc en el medio de cultivo libre de células en células A549. Los datos mostrados son los promedios de título de virus +/- desviaciones estándar de cultivos por triplicado.

Figura 3. La liberación temprana de la progenie de adenovirus recombinantes de células cancerosas humanas infectadas es aumentada por la expresión de p53. Siete líneas celulares de cáncer humanas se infectaron con la mezcla de dos virus AdE1+Luc/AdGFP, o mezcla de dos virus AdE1+Luc/Adp53 y se cultivó durante 3 días. Después de tres días, el medio de cultivo libre de células y las células se recogieron por separado y se determinó el título de virus AdE1+Luc en estas fracciones en células A549. El panel A muestra el promedio del título de virus + desviaciones estándar de cinco cultivos infectados, determinado en células infectadas con AdE1+Luc/AdGFP (barras grises), células infectadas con AdE1+Luc/Adp53 (barras negras), el medio de células infectadas con AdE1+Luc/AdGFP (barras con rayas grises/negras) o el medio de células infectadas con AdE1+Luc/Adp53 (barras con rayas blancas/negras). El panel B muestra los porcentajes promedio + desviaciones estándar de virus liberados en 3 días, en relación con la cantidad de virus presente dentro de las células y en el medio de cultivo, calculado a partir de los datos en el panel A, para cultivos infectados con AdE1+Luc/AdGFP (barras grises) y células infectadas con AdE1+Luc/Adp53 (barras negras). La significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento, es decir, títulos de virus y porcentajes de virus liberado en presencia contra la ausencia de expresión de p53, se realizó mediante la prueba Mann-Whitney de dos colas. La producción intracelular de la progenie del virus no se afectó por la expresión de p53 ( $p=0,80$ ). Por el contrario, la expresión de p53 aumentó el título en el medio ( $p=0,007$ ) y la proporción de la progenie del virus liberada en 3 días ( $p=0,004$ ).

Figura 4. La destrucción de células de osteosarcoma SaOs-2 por los adenovirus condicionalmente de replicación (CRAd) con E1A mutante y genes E3 eliminados es potenciada por la expresión de p53. Las células SaOs-2 infectadas con AdGFP (línea superior in cada panel) o Adp53 (línea inferior en cada panel) a MOI de 30 pfu/célula, solo (primera columna en cada panel) o junto con AdE1 (segunda columna en cada panel), o Ad $\Delta$ 24 (tercera columna en cada panel) a MOI de 30 pfu/célula (panel A), MOI de 10 pfu/célula (panel B) o MOI de 1 pfu/célula (panel C). Después de cinco días (paneles A y B) o seis días (panel C) de cultivo, las células adherentes se tiñeron con violeta cristal y se escanearon. El teñido es una medida semicuantitativa de la cantidad de células viables.

Figura 5. La expresión de p53 humana funcional en células cancerosas humanas infectadas con adenovirus condicionalmente de replicación que expresan p53. Las células A549 y SaOs-2 se infectaron con Ad $\Delta$ 24 o Ad $\Delta$ 24-p53 a 100 PFU/célula y se cultivaron durante hasta 4 días. (A) Se prepararon lisados celulares y se analizaron para determinar E1A, fibra y expresión de p53 mediante análisis Western. Se incluyó el análisis de  $\beta$ -Actina para controlar

la igualdad de la carga. (B) Las células se transfectaron con PG13-Luc un día antes de la infección con AdΔ24 (barras con rayas), AdΔ24-p53 (barras negras) o control simulado (barras blancas). Dos días posteriores a la infección, se midió la expresión de luciferasa en los lisados celulares. Los datos son promedios de valores de unidades de luz relativas + desviaciones estándar de un experimento representativo realizado por triplicado.

5 Figura 6. Un adenovirus condicionalmente de replicación que expresa p53 destruye células cancerosas humanas más rápidamente que el virus de control parenteral que no expresa p53. Se infectaron células A549 (panel A), SaOs-2 (panel B) y U373MG (panel C) con AdGFP (primera línea en cada panel), Adp53 (segunda línea en cada panel), AdΔ24 (tercera línea en cada panel) o AdΔ24-p53 (cuarta línea en cada panel) a una titulación por dilución MOI en el intervalo de 100 pfu/célula a 0,01 pfu/célula, tal como se indica encima de los paneles. Después de 12 días, se  
10 tiñeron las células adherentes con violeta cristal y se escanearon. El tñido es una medida semicuantitativa para la cantidad de células viables. Los datos mostrados son un ejemplo representativo de tres experimentos independientes realizados.

Figura 7. Un adenovirus condicionalmente de replicación que expresa las proteínas p53 y E1B-55kDa destruye células cancerosas humanas más rápidamente que un adenovirus condicionalmente de replicación que expresa p53 pero no la proteína E1B-55kDa. Se infectaron células A549, SaOs-2 y U373MG (tal como se indica encima de los respectivos paneles) con AdΔ55K-p53 o AdΔ24-p53 tal como se mencionó anteriormente, a una titulación por dilución en el intervalo de 100 pfu/célula a 0,001 pfu/célula, tal como se indica debajo en los paneles. Después de 14 días, se tiñeron las células adherentes con violeta cristal.

Figura 8. Un adenovirus condicionalmente de replicación que expresa p53 destruye células GBM de pacientes humanos con cáncer cerebral de forma más eficaz que los virus de control parenterales que no expresan p53. Las células GBM cultivadas durante poco tiempo de 8 pacientes diferentes se infectaron con AdΔ24 (barras blancas) o AdΔ24-p53 (barras negras) a 1 pfu/célula y se cultivaron durante 12-25 días. Se midió la supervivencia celular mediante el ensayo de conversión WST-1. Los datos mostrados son los porcentajes de supervivencia celular promedios en comparación con cultivos de control no infectados + desviación estándar de mediciones por triplicado.

Figura 9. Un adenovirus condicionalmente de replicación que expresa p53 propiedad de replicación atenuada en tejido cerebral humano normal in vitro. Las porciones de tejido cerebral se infectaron con el adenovirus recombinante indicado y se cultivaron durante 7 días. Después del cultivo, se determinó el título de virus viable contenido en las porciones de tejido mediante titulación por dilución limitante. Los datos mostrados son el promedio de los títulos de pfu por microgramo de proteína + desviación estándar de 5 (AdGFP) o 6 (todos los demás virus) porciones de tejido cerebral infectadas. La significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento se determinó mediante el ensayo de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. \*, p<0,05 comparado con AdGFP; \*\*, p<0,001 comparado con AdGFP. Todas las otras diferencias no fueron significativas.

Figura 10. Un adenovirus condicionalmente de replicación que expresa p53 ha potenciado la eficacia antitumoral en tumores humanos que crecen en el cuerpo de ratones desnudos en comparación con el virus de control parenteral que no expresa p53. Se establecieron dos tumores de neuroblastomas humanos diferentes de pacientes, es decir, NB8 (panel a la izquierda) y N91 (panel a la derecha) como líneas tumorales subcutáneas en ratones desnudos. Los ratones portaban nódulos de tumores de 100-200 mm<sup>3</sup> (8 ó 9 ratones en cada grupo de tratamiento) recibieron inyecciones intratumorales de PBS (cuadrados en blanco) como controles negativos, AdΔ24 (círculos en blanco) o AdΔ24-p53 (círculos negros). Se midió el volumen de los tumores regularmente. Los datos muestran los volúmenes de los tumores promedio de los grupos de tratamiento desde el primer día de inyección hasta el día en que el primer ratón del grupo de tratamiento tuvo que ser sacrificado porque el tamaño de su tumor era superior a 2000 mm<sup>3</sup>.

Figura 11. Eficacia anticáncer de tratamiento combinado con adenovirus condicionalmente de replicación que expresa p53 e irradiación. Células de glioma U87MG (p53 no modificado) y U373MG (mutante de p53) se sometieron a terapia de radiación de 4Gy (RT), terapia viral con 0,5 pfu/célula AdΔ24 o AdΔ24-p53, o RT seguido de terapia viral, tal como se mencionó anteriormente. Ocho días después de la infección, se determinó la supervivencia celular relativa mediante el ensayo de conversión WST-1. Los datos mostrados son los porcentajes de supervivencia celular promedios + desviación estándar en comparación con cultivos de control no infectados no irradiados.

## Ejemplos

50 Ejemplo 1. Producción de adenovirus competentes para la replicación y adenovirus condicionalmente de replicación que expresan la proteína p53 supresora de tumores humanos y adenovirus de control sin p53.

Para construir adenovirus con un casete de expresión de p53 humana en la región E3, se liberó el casete de expresión SVE-p53 (promotor temprano SV40 que controla el ADNc de p53 humana incluyendo el intrón 4) de pAdHumPwt.SVE (Ameyar y otros, Oncogene 18 (1999) :5464-5472) por digestión con KpnI y XbaI (parcial). El fragmento de 2,6 kb se insertó en KpnI/XbaI digerido pABS.4 (Microbix Biosystems, Toronto, Canadá). La construcción resultante fue designado pABS.4-p53. pABS.4-p53 fue digerida con PaeI y el fragmento de 4 kb que  
55 porta el casete SVE-p53 y el gen de resistencia a la kanamicina se insertó en pBHG11 digerido con PaeI (Microbix Biosystems). Se aisló un clon con un inserto en la orientación que sitúa el casete SVE-p53 en la hebra 1 del



adenovirus, y se designó pBHG11-p53kan-L. El gen de resistencia a la kanamicina se eliminó por digestión con Swal seguido por la auto-ligación, dando lugar a pBHG11-p53-L.

Se prepararon adenovirus competentes para la replicación mediante recombinación homóloga en células 293 (Graham y otros, J. Gen. Virol. 36 (1977) :59-72) entre pXC1 (Microbix Biosystems) o derivados de pXC1 con mutaciones en E1 que hacen los vectores condicionalmente de replicación con pBHG11 o pBHG11-p53-L. Los derivados de pXC1 fueron pXC1-Δ24, portando una delección de 24 pb en el dominio CR2 de unión a pRb en E1A (que codifica los aminoácidos LTCHEAGF; Fueyo y otros, Oncogene 19 (2000): 2-12) y pXC1-Δ55K que porta una delección del sitio Sau3AI en el serotipo 5 de adenovirus (Ad5) nt 2426 al sitio BgIII en Ad5 nt 3328, que abarca una gran parte del marco abierto de lectura de la proteína E1B-55kDa. De esta manera, se prepararon los siguientes virus: AdE1 con la región E1 no modificada, AdΔ24 con la mutación CR2 en E1A, AdΔ55K con la delección de la proteína E1B-55kDa y los tres derivados que expresan p53 AdE1-p53, AdΔ24-p53 y AdΔ55K-p53.

Los virus se purificaron en placas, se propagaron en células de carcinoma de pulmón A549 (obtenidas de ATCC, Manassis, VA), y se purificaron en gradiente de CsCl de acuerdo con técnicas estándar. Los productos purificados se dializaron extensivamente contra HEPES 10 mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glicerol al 10% y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Las mutaciones de E1 y la inserción de SVE-p53 fueron confirmadas por PCR en los productos finales. LA expresión de la proteína p53 fue confirmada por la infección de células SaOs-2 nulas de p53 (obtenidas del Dr. F. Van Valen, Westfälische Wilhelms-Universität, Munster, Alemania), seguido por análisis Western con anticuerpos anti-p53 MoAb DO-7 (Dako, Glostrup, Dinamarca). La expresión funcional de la proteína p53 que da lugar a la transactivación de los promotores dependientes de p53 fue confirmada por infección de células SaOs-2 que fueron transfectadas con el plásmido reportero dependiente de p53 PG13-Luc (El-Deiry y otros, Cell 75 (1993) 817-825 ) y la medición de la expresión de luciferasa. Los títulos de partículas de todos los adenovirus se determinaron por medición de DO260 y los títulos de unidades formadoras de placas (pfu) funcional se determinaron mediante titulación de placas por dilución limitante en 293 células de acuerdo con técnicas estándar.

#### Ejemplo 2. La expresión de la proteína p53 funcional en células infectadas por adenovirus aumenta la lisis celular.

Para demostrar que la expresión de un componente funcional de la vía de la apoptosis dependiente de p53 durante la replicación del adenovirus aumenta la lisis de la célula huésped, se utilizó un sistema de doble virus en el que las células se infectaron con cantidades iguales de los adenovirus competentes para la replicación AdE1+Luc (un amable regalo del Dr. R. Vogel, Crucell Holland BV, Leiden, Países Bajos) que se deriva de Ad5 no modificado a través de la sustitución del marco abierto de lectura gp19k en la región E3 por el gen de la luciferasa de luciérnaga y el vector defectuoso para la replicación Adp53 (Ameyar y otros, Oncogene 18 (1999): 5464-5472), que expresa la proteína p53 humana no modificada. Este sistema de doble virus crea una situación en la que p53 se expresa en el contexto de un adenovirus de replicación. Como control negativo, Adp53 se sustituyó por el vector de control irrelevante AdGFP (que expresa proteína verde fluorescente mejorada controlada por el promotor CMV; van Beusechem y otros, Gene Ther. 7 (2000): 1940-1946). En otros cultivos de control, las células se infectaron con AdGFP o Adp53 solamente, para investigar el efecto de la inducción de apoptosis o detención del crecimiento por p53 por sí misma. Un panel de líneas celulares de cáncer humano, con diferentes estados de p53 se sometió a infección por virus (doble) y se controló la viabilidad celular durante un período de dos semanas. Las líneas celulares incluyeron: células de osteosarcoma SaOs-2, que portan una delección del gen p53 homocigótico (Masuda y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) :7716-7719); líneas celulares HT-29 de carcinoma de colon y U373MG de glioma, que portan una mutación en el codón 273 R a H en su gen p53 (Van Meir y otros, Cancer Res. 54 (1994): 649-652; Rodrigues y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) :7555-7559); células de carcinoma de ovario OVCAR-3, que portan una mutación en el codón 248 R a Q en su gen p53 (Yaginuma y Westphal, Cancer Res. 52 (1992): 4196-4199), y células de carcinoma de pulmón A549, que expresan la proteína p53 no modificada (Lehman y otros, Cancer Res. 51 (1991): 4090-4096). Las células SaOs-2 se obtuvieron del Dr. F. Van Valen, Westfälische Wilhelms-Universität, Munster, Alemania, todas las demás líneas se adquirieron de ATCC, Manassis, VA, EE.UU.. Todas las líneas celulares se sembraron a razón de 5.10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de 24 pocillos en F12-DMEM/FCS al 10% y se cultivaron durante toda la noche. Al día siguiente, se preparó la mezcla de dos virus con igual título de pfu de AdE1+Luc con AdGFP o AdE1+Luc con Adp53 en F12-DMEM con 2% de FCS. Las mezclas se utilizaron para infectar células SaOs-2 en una multiplicidad de infección (MOI) de 50 pfu/célula; las células A549 y U373MG a 100 pfu/célula, las células OVCAR-3 y HT29 a 500 pfu/célula de cada virus durante 1 hora a 37°C. A continuación, las células se lavaron una vez con 1 ml de F12-DMEM/10% de FCS y posteriormente cultivaron en 0,5 ml de F12-DMEM/10% de FCS a 37°C durante hasta 14 días. Este procedimiento dio lugar a una infección eficiente, tal como se evidencia por la expresión de GFP detectable en la mayoría de las células infectadas con AdGFP dos días después de la infección. Por lo tanto, muchas células contenían ambos virus que permiten a las proteínas de E1 proporcionadas por AdE1+Luc transcomplementar la replicación de Adp53 o AdGFP. En varios puntos de tiempo, se determinó la viabilidad celular mediante la eliminación del medio de cultivo y su sustitución por 200 μl de reactivo WST-1 al 10% (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en el medio de cultivo. Dependiendo del tipo y la densidad de la célula, se dejó proceder la formación del colorante formazano durante 30-60 minutos a 37°C. Cien μl de medio WST-1 se transfirieron a una placa de ELISA de 96 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) y se midió la DO<sub>450</sub>.

La conversión de WST-1 se expresó como un porcentaje de la conversión por las células de control no infectadas, después de la sustracción de los valores de fondo de WST-1 incubadas en ausencia de células.

Como puede observarse en la figura 1, la destrucción celular inducida por AdE1+Luc/AdGFP se retrasó gravemente en líneas celulares deficientes en p53 SaOs-2, HT-29 y OVCAR-3 en comparación con células carcinoma de pulmón A549 con p53 no modificada. La línea de células U373MG mutante de p53 mostró una velocidad intermedia de destrucción celular inducida por adenovirus. La infección con Adp53 por sí solo afectó las líneas celulares deficientes en p53 SaOs-2 y OVCAR-3 en varios grados durante los primeros días después de la infección, pero no tuvo efecto significativo sobre la viabilidad de las células A549 con p53 no modificada y células HT-29 o U373MG con p53 mutante. Además, todos los cultivos infectados por Adp53 se recuperaron completamente durante el curso del experimento, mostrando que la expresión de p53 funcional sola no da lugar a un medio eficaz para destruir las células cancerosas. Es importante destacar que las células infectadas con AdE1+Luc/Adp53 fueron destruidas mucho más rápido y de forma más eficaz que las células de control infectadas con AdE1+Luc/AdGFP. La expresión de p53 funcional aceleró la destrucción de todas las líneas celulares, excepto HT-29, como mínimo, por 3 días, independientemente del estado de p53 en las líneas celulares. Sorprendentemente, las células OVCAR-3 realmente requirieron de la expresión de p53 para ser sensibles a la destrucción celular inducida por adenovirus. Por lo tanto, en la mayoría de líneas celulares de cáncer ensayadas, la combinación de adenovirus de replicación y la expresión de p53 no modificada dio lugar a la destrucción más rápida y eficaz de las células.

Ejemplo 3. La expresión de la proteína p53 funcional en las células infectadas con adenovirus acelera la liberación de virus de la progenie.

Para demostrar que la lisis celular aumentada debido a la expresión de un componente funcional de la vía de apoptosis dependiente de p53 durante la replicación del adenovirus da lugar a una liberación más temprana de la progenie del virus, se realizó el mismo experimento de infección de doble virus tal como se describe en el ejemplo 2 y en diversos puntos de tiempo durante el período de cultivo de 14 días y se determinó el título del virus AdE1+Luc en el medio de cultivo de células infectadas con doble virus. Para este fin, el medio de cultivo se cosechó y se aclaró por centrifugación. El sobrenadante libre de células se diluyeron en serie en F12-DMEM/FCS al 10% y se utilizó para infectar las células A549 sembradas a  $10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos 24 horas antes de la infección. Se incluyó una titulación de control del virus AdE1+Luc con título de pfu conocido. Después de 20-24 horas, el medio de cultivo fue sustituido por Tampón de Lisis de Reportero del Sistema de Ensayo Quimioluminiscente de Luciferasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.) y las placas de cultivo se sometieron a un solo ciclo de congelación/descongelación. La quimioluminiscencia se midió con un luminómetro Lumat LB 9507 (EG & G Berthold, Bad Wildbad, Alemania) durante los 10 segundos inmediatamente después de la adición del lisado de células al Reactivo de Ensayo de Luciferasa. Los valores en el intervalo lineal de la dilución en serie se utilizaron para calcular el título de unidad infecciosa de luciferasa (UI). Este ensayo fue lineal en 3-4 órdenes de magnitud, con un umbral de aproximadamente  $10^3$  pfu.

La figura 2 muestra que la velocidad de liberación del virus de las células de control infectadas con AdE1+Luc/AdGFP se correlaciona con el estado de p53 de la célula. Tres días después de la infección, las células A549 con p53 no modificada ya habían perdido más de  $10^7$  IU en el medio, mientras las células SaOs-2 nulas de p53 mostraron títulos 250 veces más bajos y células que expresan p53 mutante produjeron cantidades intermedias. La introducción de p53 funcional por medio de infección con AdE1+Luc/Adp53 mejoró los títulos de virus en el medio de todas las líneas celulares poco después de la infección (con un intervalo de 3 a 20 veces), independientemente del estado de p53 en la línea celular. En el caso de las células SaOs-2, en las que la mejora de la lisis dependiente de p53 era más prominente, la aceleración de la liberación de virus fue a expensas de una disminución en la cantidad total de virus producido durante el período de 14 días. La destrucción rápida de células SaOs-2 infectadas con AdE1+Luc/Adp53 redujo la producción de virus total aproximadamente 100 veces en el experimento mostrado en la figura 2 y aproximadamente 20 veces en un segundo experimento independiente. La producción de virus por las otras líneas celulares no se vio influenciada negativamente por la introducción de p53 no modificada. Por el contrario, la expresión de p53 funcional mejoró la producción total de virus en el medio de células HT-29 y U373MG.

La acumulación más rápida de partículas víricas infecciosas en el medio de cultivo podría ser el resultado de una producción acelerada de virus y/o una liberación más temprana del virus. Para evaluar la causa de las diferencias de titulación observadas rápidamente tras la infección, se determinó el título virus de AdE1+Luc en lisados celulares, así como en medios de cultivo de células infectadas 3 días después de la infección. Para este fin, el medio de cultivo se cosechó y se aclaró por centrifugación. El sobrenadante libre de células se utilizó para medir los títulos de virus liberado AdE1+Luc. Las células no adherentes recogidas por centrifugación y las células adherentes recogidas de la placa de cultivo se combinaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación. El lisado se utilizó para medir el título de virus AdE1+Luc dentro de las células. Se utilizó el mismo método para determinar el título de virus tal como se ha descrito anteriormente. Este experimento se realizó en el mismo conjunto de líneas de células anterior y en dos líneas de células adicionales cancerosas con p53 no modificadas, es decir, H460 de células de carcinoma de pulmón de grandes células (cultivado en RPMI-1640/10% de FCS) y células de carcinoma de mama MCF-7.

Como se puede observar en la figura 3A, la cantidad de virus funcional producido en las células infectadas en 3 días no se vio afectada significativamente por la expresión de p53 (promedio 2,3 veces mayor en líneas celulares diferentes; en el intervalo desde una disminución de 4 veces en SaOs-2 a un aumento de 7 veces en HT-29), mientras que el título en el medio aumentó por expresión de p53 en todas las líneas celulares (promedio de 45 veces mayor; en el intervalo de 1,6 veces en OVCAR-3 a 143 veces en A549). En cultivos infectados con

AdE1+Luc/AdGFP, sólo un 0,05-2.1% de la progenie total de virus fue liberado en tres días (véase la figura 3B). La expresión de p53 aumentó grandemente la liberación del virus (un promedio de 20,4 veces, en el intervalo de 2,8 veces a 68 veces), resultando en un 1,1-14,5% del total de virus ya liberado en el plazo de tres días (véase la figura 3B). Por lo tanto, la expresión de p53 durante la replicación del adenovirus aumentó de forma reproducible liberación temprana de la progenie de virus de la célula.

Ejemplo 4. La lisis de las células cancerosas infectadas con adenovirus recombinantes competentes para la replicación o con adenovirus recombinantes condicionalmente de replicación se ve reforzada por la expresión de la proteína p53 funcional.

Para el tratamiento del cáncer, son de particular interés los adenovirus condicionalmente de replicación (CRAd). Los CRAd difieren de los adenovirus competentes para la replicación en mutaciones específicas en su genoma. Un tipo importante de CRAd es uno que produce proteínas de E1A incapaces de unirse a pRb (AdΔ24). Para investigar si la presente invención es relevante en el contexto de AdΔ24, se infectaron células de cancerosas SaOs-2 con mezclas de virus doble que consistían en los siguientes componentes: (1) AdE1 (con la región E1 no modificada pero eliminada la región E3) o AdΔ24 (con una delección en el dominio CR2 de unión a pRb en E1A y eliminada la región E3) a una MOI de 30, 10 ó 1 pfu/célula, junto con (2) AdGFP o Adp53 a una MOI de 30 pfu/célula. Las MOI fueron seleccionadas de tal manera que la mayoría de las células podrían estar infectadas con el componente (2) y también con el componente (1) en el mayor MOI usado, pero a un MOI menor no todas las células podrían estar inicialmente infectadas con el componente (1). En este último caso, se requiere más de un ciclo de replicación del adenovirus para erradicar la población celular entera.

El mismo método para administrar los virus a las células se utilizó tal como se describió en el ejemplo 2. Cinco o seis días después de la infección, el medio de cultivo se retiró y las células adherentes se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con formaldehído al 4% en PBS y se tiñeron posteriormente utilizando un 1% de colorante violeta cristal en etanol al 70% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de varios lavados con agua, las placas de cultivo se secaron al aire. El resultado de este experimento se muestra en la figura 4. Las manchas de colorante violeta cristal son todas las células que quedan en la superficie de la placa de cultivo. Por lo tanto, menos manchas indica que hay más células han sido destruidas por los adenovirus recombinantes. A partir de este experimento, se pueden extraer las siguientes conclusiones: (1) los dos adenovirus recombinantes AdE1 y AdΔ24 fueron capaces de destruir células SaOs-2, (2) en ausencia de expresión de la proteína p53, ninguno de los dos virus fue capaz de erradicar completamente la monocapa de células de SaOs-2 durante el período del experimento, y (3) la expresión de la proteína p53 funcional mejora mucho la destrucción de células SaOs-2 por ambos adenovirus recombinante, demostrando que (4) la expresión de p53 aumentó el número de ciclos de replicación líticos completados por AdE1 y AdΔ24 en el transcurso del experimento. Estos hallazgos fueron confirmados en diversos experimentos independientes utilizando mezclas de dos virus a diferentes MOI en células SaOs-2, A549 y células U373MG. Se observó una oncolisis mejorada de diez a 100 veces cuando se expresó p53. La mejora fue similar para AdE1 y AdΔ24. En conclusión, la expresión de un componente funcional de la vía de apoptosis dependiente de p53 aumenta la lisis de las células cancerosas por adenovirus recombinantes competentes para la replicación, así como por adenovirus recombinantes condicionalmente de replicación. Por tanto, las mutaciones específicas que se introducen en el genoma del adenovirus para construir el CRAd AdΔ24 no interfieren con la potenciación de la oncolisis por un componente funcional de la vía de apoptosis dependiente de p53. Además, como ambos virus carecen de región E3 funcional, el experimento demostró que la región E3 funcional no es requerida para mejorar la lisis de células cancerosas por expresión de un componente funcional de la vía de apoptosis dependiente de p53. La lisis de células cancerosas acelerada y la liberación del virus acelerada concomitante, que permiten una propagación más rápida del virus a través de la población de células cancerosas, debido a la expresión de p53, dio lugar a una destrucción más rápida de toda la población de células cancerosas. Esto subraya aún más la relevancia de la invención para aplicaciones en el área del tratamiento del cáncer.

Ejemplo 5. El adenovirus condicionalmente de replicación AdΔ24-p53 expresa la proteína p53 funcional durante la replicación en células cancerosas.

El adenovirus condicionalmente de replicación AdΔ24 según la presente invención se analizó para determinar la expresión de la proteína p53 funcional durante la replicación en células cancerosas mediante análisis de transferencia Western (figura 5A) y ensayo de transactivación específico de p53 (figura 5B). Para el análisis de transferencia Western, se sembraron células cancerosas SaOs-2 nulas de p53 y A549 con p53 no modificada en placas de 6 pocillos a una densidad de  $5 \cdot 10^5$  células por pocillo. Al día siguiente, las células se infectaron con AdΔ24 o AdΔ24-p53 a 100 pfu/célula durante una hora, se lavaron una vez en medio y se incubaron en medio fresco a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24, 48, 72 y 96 horas de incubación, las células se recogieron y se lisaron en 200 μl de NaCl 140 mM, trietanolamina 0,2 M, deoxicolato 2 g/litro, fenilmetanosulfonilfluor 1mM, antipaina 50 μg/μl mediante tres ciclos de congelación/descongelación. Los lisados se clarificaron por centrifugación y se determinaron las concentraciones de proteína utilizando el Kit de Ensayo de Proteína BCA (Pierce, Rockford, IL). Se separaron cantidades iguales de proteína (15 μg) en un gel SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad, Hercules, CA). Los inmunoblots se procesaron según procedimientos estándar, utilizando anticuerpos primarios para p53 (DO-7; DAKO, Glostrup, Dinamarca), E1A (SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), fibra (4D2; Lab Vision, Fremont, CA) o β-actina (AC-15; Sigma, Saint Louis, MO), seguido de conjugado anti-IgG-HRPO (DAKO) y reactivo de detección quimioluminiscente Lumilight o Lumilight<sup>plus</sup> (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Como

se observa en la figura 5A, el adenovirus E1A y proteínas de fibra, que indican las fases de replicación temprana y tardía, se detectaron en células infectadas con AdΔ24, comenzando desde 1 y 2 días posteriores a la infección, respectivamente. Los niveles de p53 endógenos en células A549 fueron suprimidos debido a la replicación de AdΔ24 3 días después de la infección. Tal como se esperaba, no se detectó p53 en células SaOs-2 nulas de p53 antes y después de la infección con AdΔ24. Por el contrario, se detectó p53 exógena en células SaOs-2 1 día después de la infección con AdΔ24-p53. Posteriormente, esta expresión de p53 disminuyó de forma similar a las células A549 infectadas con CRAd. Por lo tanto, AdΔ24-p53 expresó p53 en células cancerosas deficientes de p53 a niveles regulados comparables a los que se encontró en células infectadas con CRAd con p53 no modificada. De forma interesante, AdΔ24-p53 parece replicarse más rápido que AdΔ24 en ambas líneas celulares. En células infectadas con AdΔ24-p53, la expresión de fibra fue detectable antes y la expresión de p53 disminuyó más rápido. La actividad funcional de la p53 introducida por transactivación específica del plásmido reportero PG13-Luc que contiene un gen luciferasa unido a un promotor dependiente de p53 (el-Deiry y otros, Cell 75 (1993): 817-825). Las células se sembraron a  $5 \cdot 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos, y se transfectaron con el plásmido reportero dependiente de p53 PG13-Luc utilizando Lipofectamina PLUS (Life Technologies, Paisley, UK), según el método descrito por el fabricante. Al día siguiente, las células se infectaron con AdΔ24 o AdΔ24-p53 durante 1 hora a 100 pfu/célula. Las células se cultivaron durante 2 días y la actividad de luciferasa se midió tal como en el ejemplo 3. La transactivación dependiente de p53 se expresó como la actividad de luciferasa en unidades de luz relativas, después de la sustracción de la expresión de fondo en células transfectadas con un plásmido de control irrelevante. La figura 5B muestra que la actividad de luciferasa en células SaOs-2 transfectadas con PG13-Luc se mantuvo baja después de la infección con AdΔ24, pero aumentó de forma marcada después de la infección con AdΔ24-p53, lo que indica que la expresión de p53 provocó la transactivación de los genes dependientes de p53. Por lo tanto, mientras que AdΔ24-p53 se replicaba en células cancerosas deficientes en p53 o con p53 no modificada, la p53 exógena se expresó de una manera regulada y esta proteína transactivó funcionalmente genes efectores aguas debajo de la vía de apoptosis dependiente de p53.

#### 25 Ejemplo 6. Los adenovirus condicionalmente de replicación que expresan p53 funcional muestran potencia oncolítica incrementada en células cancerosas

Para investigar si la lisis celular mejorada y la liberación de la progenie del virus acelerada debido a la expresión de p53 funcional podría también lograrse si la proteína p53 es expresada a partir de un inserto estable en el genoma de un CRAd, se comparó la potencia oncolítica del CRAd que expresa p53 AdΔ24-p53 con la del CRAd parental AdΔ24. Se sembraron células A549, U373MG y SaOs-2 a  $5 \cdot 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos en F12-DMEM/10% FCS y se cultivaron durante toda la noche. Al día siguiente, las células se infectaron con AdGFP o Adp53 o AdΔ24 o AdΔ24-p53, se diluyeron en F12-DMEM con un 2% de FCS para alcanzar una MOI de 100 pfu/célula, 10 pfu/célula, 1 pfu/célula, 0,1 pfu/célula o 0,01 pfu/célula, durante 1 hora a 37°C. A continuación, el medio que contenía el virus se reemplazó por 1 ml de F12-DMEM/10% de FCS y las células se cultivaron a 37°C. Después de una semana, se refrescó el 50% del medio de cultivo. Después de 12 días, se eliminó el medio de cultivo y las células adherentes se tiñeron con violeta cristal, tal como se describe en el ejemplo 4. Tal como se observa en la figura 6, el virus de control AdGFP no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células. El virus Adp53 sólo tuvo un efecto inhibitorio moderado sobre células SaOs-2 en el MOI más alto. AdΔ24 mostró una actividad lítica dependiente de la dosis en las tres líneas celulares. Lo más importante, AdΔ24-p53 destruyó las tres líneas celulares de cáncer con mayor eficacia que AdΔ24. Se requirió de un título aproximadamente 100 veces menor, más de 100 ó 10 veces menor de AdΔ24-p53 que de AdΔ24 para lograr similar potencia de destrucción en células cancerosas A549, U373MG y SaOs-2, respectivamente. Por lo tanto, la expresión de un componente funcional de la vía de apoptosis dependiente de p53 a partir de un inserto estable en el genoma de un adenovirus recombinante condicionalmente de replicación mejoró la potencia oncolítica de dicho adenovirus recombinante de 10-100 veces. La potencia oncolítica se mejoró con independencia del fondo genético de p53 de las células cancerosas.

En experimentos independientes, un panel mayor de líneas celulares de cáncer humano se sometió al mismo análisis para determinar la potencia oncolítica de AdΔ24-p53 frente a AdΔ24. La expresión de p53 a partir de un inserto estable en el genoma de AdΔ24 dio como resultado una potencia oncolítica mejorada en las células de carcinoma epitelial A431; células de cáncer del cerebro, U87MG, U251MG, U118MG y U373MG; células de carcinoma de mama MDA-MB-231 y MCF-7; células de carcinoma de cuello uterino HeLa; células de carcinoma de pulmón A549 y H460; células de carcinoma de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3; células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello H11B y 22A; células de carcinoma de próstata PC-3, células de cáncer de vesícula T24, células de cáncer de hígado HepG2; células de osteosarcoma SaOs-2; células de neuroblastoma NJB, CHP212, SH-SY5Y y SK-NAS; células de carcinoma de colon SW1398, Colo205 y HT-29 y células de carcinoma gástrico HMO2 y MKN28. De un total de 32 líneas celulares de cáncer humano sometidas a este análisis hasta el momento, 27 (es decir, un 84%) mostraron lisis inducida por AdΔ24 mejorada debido a la expresión de p53. Por lo tanto, la presente invención tiene una amplia aplicación para una variedad de tipos de cáncer.

#### 50 Ejemplo 7. Comparación de la potencia oncolítica de AdΔ24-p53 y AdΔ55K-p53.

60 Para investigar el papel de la proteína E1B-55kDa en adenovirus recombinantes según la presente invención, se comparó la potencia oncolítica de AdΔ24-p53 (con el gen E1B-55kDa intacto) con AdΔ55R-p53 (con el gen E1B-55kDa eliminado) utilizando el mismo método tal como se describe en el ejemplo 6. Se incluyeron 3 líneas celulares

de cáncer humano con diferentes estados de p53 que habían mostrados diferentes susceptibilidades a la oncolisis mejorada debido a la expresión de p53, es decir, células SaOs-2 nulas de p53 (oncolisis mejorada aproximadamente 10 veces), células A549 con p53 no modificada (oncolisis mejorada aproximadamente 100 veces) y células U373MG con p53 mutante (oncolisis mejorada más de 100 veces). La figura 7 muestra el resultado del teñido con violeta cristal realizado el día 14 después de la infección. Como se puede observar, Ad $\Delta$ 24-p53 fue mucho más potente (aproximadamente 100 veces) en las tres líneas celulares que Ad $\Delta$ 55K-p53. Por lo tanto, todas o casi todas ganaron en potencia oncolítica por la inclusión del gen p53 en el genoma de Ad $\Delta$ 24 y se perdió por la eliminación del gen E1B-55kDa. Por lo tanto, es muy preferente que los adenovirus recombinantes según la presente invención comprendan un gen E1B-55kDa funcional. Ad $\Delta$ 55R-p53 se diseñó tal como se describe en los documentos WO 00/29573 y WO 01/74403. Por lo tanto, este ejemplo demuestra que los adenovirus recombinantes de la presente invención proporcionan una destrucción mucho más eficaz de una población de células cancerosas que los adenovirus recombinantes según WO 00/29573 y WO 01/74403.

Ejemplo 8. Ad $\Delta$ 24-p53 muestra eficacia anticáncer mejorada contra muestras de tumores cerebrales primarios de pacientes humanos.

Es un objetivo de la presente invención utilizar los adenovirus recombinantes de la presente invención para el tratamiento del cáncer en humanos. Para evaluar la utilidad de los adenovirus recombinantes de la presente invención para este propósito, se evaluó la potencia oncolítica de los adenovirus recombinantes de la presente invención en muestras de tumores cultivados de corta duración de ocho pacientes con cáncer cerebral. Se recogió material de tumor fresco durante la cirugía del tumor cerebral después de un consentimiento informado y se procesó en 3 horas después de la disección. Se llevó a cabo la confirmación patológica del diagnóstico en el material cerebral y se procesó para cultivar las células. Todas las muestras incluidas en el estudio se caracterizaron como glioblastomas multiformes (GBM). Las células de GBM primarias se obtuvieron después de la disociación mecánica del material de resección del tumor y se cultivaron en DMEM complementado con 10% de FCS y antibióticos. Los experimentos de replicación del CRAd se llevaron a cabo antes del paso 10. Dependiendo del tamaño celular, los cultivos de células de GBM de corta duración se sembraron de 2 a  $5 \cdot 10^5$  células por pocillo para preparar monocapas subconfluentes en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, las células se infectaron a 1 pfu/célula con Ad $\Delta$ 24 o Ad $\Delta$ 24-p53 durante 1 hora a 37°C, o se cultivaron en medio como control negativo. Posteriormente, el virus se reemplazó por medio de cultivo y las células se cultivaron a 37°C durante 12-25 días hasta que los efectos citopatogénicos se hicieron aparentes, en cuyo tiempo se analizaron para determinar la supervivencia celular mediante el ensayo de conversión de WST-1. Todas las células (adherentes y no adherentes) se recogieron y se resembraron en valoraciones por triplicado en placas de cultivo de 96 pocillos y se cultivaron en medio de cultivo WST-1 al 10% (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante hasta 16 horas de la medición de OD<sub>450</sub>. Se utilizaron los valores en el intervalo lineal para calcular la supervivencia relativa en comparación con células de control no infectadas, después de la sustracción del fondo. Los resultados obtenidos en el panel de cultivos de GBM se muestran en la figura 8. Como se puede observar, Ad $\Delta$ 24 destruyó solamente una muestra (VU-78) de forma eficaz, mientras que todas las demás muestras fueron más resistentes a este virus. Ad $\Delta$ 24-p53 fue más eficaz que Ad $\Delta$ 24 en 5 de estas muestras resistentes. Dos muestras (AMC3203 y VU-83) fueron resistentes a ambos virus. Se puede establecer que esto fue debido a la falta de expresión del receptor de adenovirus en las superficies de estas células (no mostrado). Por lo tanto, el CRAd Ad $\Delta$ 24 mostró potencia oncolítica en una de ocho muestras de GBM, mientras que Ad $\Delta$ 24-p53 destruyó seis de ocho muestras. Estos hallazgos muestran que los adenovirus recombinantes de la presente invención presentan potencia oncolítica aumentada contra células enfermas de humanos que sufren de una enfermedad que implica una supervivencia celular inadecuada.

Ejemplo 9. La expresión de p53 funcional a partir del genoma de un adenovirus condicionalmente de replicación no afecta las propiedades de replicación condicional del adenovirus recombinante.

Los adenovirus condicionalmente de replicación deben mostrar propiedades de replicación atenuadas en tejidos no malignos. Para evaluar esto en los adenovirus recombinantes según la presente invención, se examinó la replicación de Ad $\Delta$ 24-p53 en tejido cerebral humano normal y se comparó con la replicación en este tejido por el CRAd de control parental Ad $\Delta$ 24, por Ad5 no modificado (control positivo de adenovirus competente para la replicación), por AdGFP (control negativo de adenovirus deficiente para la replicación) y Ad5- $\Delta$ 24RGD (Suzuki y otros, Clin. Cancer Res. 7 (2001): 120-126; un CRAd con la mutación  $\Delta$ 24 en el dominio CR2 de E1A, una inserción del motivo RGD en el gen de la fibra y una región E3 intacta). Una porción de tejido cerebral normal se eliminó del tracto corticotómico durante la cirugía de un paciente con meningioma y se cortó en pequeños pedacitos de pocos mm, utilizando agujas 23 Gauge. Los pedacitos se lavaron dos veces en medio de cultivo y se sometieron individualmente a  $10^8$  pfu de adenovirus (AdGFP: 5 pedacitos; todos los otros adenovirus: 6 pedacitos) en 100 microlitros de medio de cultivo durante 1,5 horas. Posteriormente, se lavaron en 1 ml de medio de cultivo y se cultivaron en 200 microlitros de medio de cultivo durante 7 días a 37°C. Dos días después de la infección, se confirmó la infección exitosa mediante la detección de proteína verde fluorescente en los pedacitos de tejidos transducidos con AdGFP. En el día 7, todos los pedacitos se lavaron con 1 ml de PBS y se congelaron a -80°C en 250 ml de PBS. Los pedacitos se lisaron mediante tres ciclos congelación/descongelación a 37°C en nitrógeno líquido, seguido de clarificación por centrifugación. El contenido de proteína de los lisados se determinó utilizando el Kit de Ensayo de Proteína BCA (Pierce, Rockford, IL). El título de adenovirus infeccioso en cada lisado se determinó por titulación por dilución limitante en 293 células por triplicado utilizando procedimientos estándar. Las diferencias entre los títulos producidos por los diferentes adenovirus se determinó con la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. La

figura 9 muestra los títulos de adenovirus a los 7 días posteriores a la infección en los tejidos, normalizados por microgramo de proteína. Como se puede observar, el tejido cerebral humano que estaba infectado con el virus AdGFP de control deficiente de la replicación contenía un título bajo de adenovirus, lo que indica que algún AdGFP residual aún estaba presente después de 7 días. Los tejidos que fueron infectados con virus Ad5 de control competente de la replicación contenían mucho más virus (título más de 1000 veces mayor;  $p < 0,05$ ), demostrando que la replicación de adenovirus no modificados durante 7 días de cultivo dio lugar a una progenie de adenovirus infecciosa. El CRAAd Ad $\Delta$ 24 mostró un título de salida aproximadamente 40 veces menor que Ad5, confirmando que su replicación está atenuada en tejido normal. El título de adenovirus Ad $\Delta$ 24-p53 según la presente invención no fue significativamente diferente del de Ad $\Delta$ 24 (solamente 1,7 veces mayor;  $p > 0,05$ ). Además, la producción de virus de tejido cerebral infectado con Ad $\Delta$ 24 o Ad $\Delta$ 24-p53 no fue significativamente diferente del de los tejidos infectados con AdGFP ( $p > 0,05$ ). Por lo tanto, la replicación atenuada debido a la mutación  $\Delta$ 24 se conservó en el adenovirus según la presente invención. Por el contrario, Ad5- $\Delta$ 24RGD se replicó tan bien en tejido cerebral normal como lo hizo el adenovirus de control Ad5 no modificado y produjo significativamente más virus que el control AdGFP ( $p < 0,001$ ). Por lo tanto, Ad5- $\Delta$ 24RGD no mostró una propiedad de replicación condicional. Posiblemente, esto fue debido a la expresión de proteína codificada por E3 en células infectadas con Ad5- $\Delta$ 24RGD. Si es así, esto podría indicar que la modificación del genoma del CRAAd según la presente invención es preferente sobre otras estrategias con el objetivo de mejorar la capacidad lítica de un CRAAd, tales como la expresión del gen E3-11.6kDa.

Ejemplo 10. Ad $\Delta$ 24-p53 muestra eficacia anticáncer mejorada contra xenoinjertos de tumor de neuroblastoma humano que crecen en ratones desnudos.

Para evaluar la potencia anticáncer de los adenovirus recombinantes de la presente invención en un cuerpo animal *in vivo*, se inyectaron Ad $\Delta$ 24 y Ad $\Delta$ 24-p53 durante 5 días consecutivos a  $10^8$  pfu por inyección en tumores de neuroblastoma humano que crecen como xenoinjertos en los flancos de ratones desnudos. Como control negativo, los ratones recibieron inyecciones de PBS. Posteriormente, se midió el tamaño de los tumores regularmente utilizando pinzas y se calcularon los volúmenes utilizando la fórmula: volumen ( $\text{mm}^3$ ) = (longitud (mm) x ancho<sup>2</sup> ( $\text{mm}^2$ ))/2. La velocidad de crecimiento del tumor (es decir, el tiempo requerido para alcanzar 5X del volumen del tumor al inicio del experimento) se calculó para cada animal individual. Las diferencias entre las velocidades de crecimiento del tumor de los diferentes grupos de tratamiento se determinaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. Tal como se puede observar en la figura 10, las inyecciones con Ad $\Delta$ 24 dieron lugar a una pequeña demora del crecimiento del tumor, pero no significativa ( $p > 0,05$ ) en comparación con los controles inyectados con PBS en tumores NB8 y no tuvieron ningún efecto en los tumores N91. Por el contrario, Ad $\Delta$ 24-p53 dio lugar a una demora significativa del crecimiento del tumor en ambos xenoinjertos de neuroblastoma humano (NB8: promedio 29 días,  $p < 0,01$ ; N91: promedio 38 días,  $p < 0,001$ ). Estos hallazgos muestran que los adenovirus recombinantes según la presente invención tienen una potencia inhibidora del crecimiento aumentada contra tumores sólidos humanos que crecen en un cuerpo animal.

Ejemplo 11. La combinación de Ad $\Delta$ 24-p53 junto con irradiación muestra eficacia anticáncer más eficaz contra células de glioma humano que cualquier tratamiento por sí solo, o la combinación de Ad $\Delta$ 24 con irradiación.

La eliminación de células cancerosas con los CRAAd ha demostrado ser más eficaz cuando el tratamiento se combina con agentes quimioterapéuticos o irradiación (por ejemplo, Heise y otros, *Nature Med.* 3(1997): 639-645; Yu y otros, *Cancer Res.* 61(2001): 517-525; Rogulski y otros, *Cancer Res* 60(2000): 1193-1196; Chen y otros, *Cancer Res.* 61(2001): 5453-5460). Por lo tanto, se investigó si el tratamiento combinado con irradiación y el adenovirus recombinante según la presente invención podría también ser más eficaz que cualquier tratamiento por sí solo. Las células de cáncer cerebral humano U87MG (p53 no modificada) y U373MG (p53 mutante) se sembraron  $5 \cdot 10^4$  células por pocillo en placas de 24 pocillos un día antes de comenzar el tratamiento, en el que (a) no tratado, (b) irradiado con una dosis subletal de 4 Gy de radiación gamma, (c) infectado con 0,5 pfu/célula de CRAAd de control parental Ad $\Delta$ 24, (d) sometido a irradiación gamma de 4 Gy seguido de infección con 0,5 pfu/célula de CRAAd de control parental Ad $\Delta$ 24 1 día después, (e) infectado con 0,5 pfu/célula de CRAAd Ad $\Delta$ 24-p53 según la presente invención, o (f) sometido a irradiación gamma de 4 Gy seguido por inyección con 0,5 pfu/célula de CRAAd Ad $\Delta$ 24-p53 según la presente invención 1 día después. Después de cultivar las células a 37°C durante 8 días, se analizó la supervivencia celular mediante la medición de conversión de WST-1, tal como en el ejemplo 2. Tal como se puede observar en la figura 11, la radiación por sí sola disminuyó la viabilidad celular en células U87MG y U373MG solo aproximadamente un 10 y un 20%, respectivamente. El tratamiento con Ad $\Delta$ 24 solo tuvo de forma similar poco efecto en ambas líneas celulares. Tal como se observó anteriormente, Ad $\Delta$ 24-p53 por sí solo fue más eficaz que Ad $\Delta$ 24 (aproximadamente un 40% de destrucción de U87MG y un 80% de destrucción de U373MG). El tratamiento de combinación de irradiación seguida de infección con el CRAAd fue más eficaz que cualquier tratamiento solo, para Ad $\Delta$ 24 y Ad $\Delta$ 24-p53. Lo más importante, la eficacia celular anticáncer mayor se obtuvo con la combinación de irradiación con el CRAAd Ad $\Delta$ 24-p53 según la presente invención (72% y 87% de destrucción de U87MG y U373MG, respectivamente). Por lo tanto, se confirmó la eficacia aumentada del tratamiento de combinación con CRAAd e irradiación para los adenovirus recombinantes según la presente invención, y (2) la eficacia mejorada de los adenovirus recombinantes según la presente invención en comparación con los adenovirus de control se conservó en el contexto del tratamiento combinado con irradiación.

Ejemplo 12. Producción de adenovirus condicionalmente de replicación que expresan una proteína mutante de p53 resistente a la degradación por MDM2.

Se ha demostrado previamente que un mutante de p53 con dos sustituciones de aminoácidos en las posiciones 14 y 19 conserva aproximadamente un 50% de actividad de transactivación y un 60% de afinidad de unión a adenovirus E1B-55kDa, pero solo aproximadamente un 1% de afinidad de unión a MDM2 en comparación con la p53 no modificada (Lin y otros, *Genes & Dev.* 8 (1994): 1235-1246). Para construir adenovirus según la presente invención que expresan esta p53 mutante, se introdujeron dos sustituciones de nucleótidos simples que cambian estos aminoácidos (T>A, L14Q y T>G, F19C) en el gen p53 en el plásmido pABS.4-p53 (véase ejemplo 1) por mutagénesis de sitio directo mediada por PCR utilizando polimerasa Pfu (Stratagene). En primer lugar, se prepararon dos productos de amplificación por PCR utilizando (1) cebador aguas arriba 5'-CGTTTCCCGTTGAATATGGC-3' y el cebador de mutación 5'-CTGAACATGTTTCTGACTCTGAGGGGGCTC-3' para amplificar un fragmento de 651 pares de base; y (2) un cebador de mutación 5'-CCTCAGAGTCAGGAAACATGTTTCAGACC-3' y cebador aguas abajo 5'-GAAGTCTCATGGAAGCCAGC-3' para amplificar un segundo fragmento de 376 pares de bases a partir de pABS.4-p53. A continuación, los dos productos de la amplificación se mezclaron y se amplificaron utilizando los cebadores aguas arriba y aguas abajo para generar un producto de amplificación de 1002 pares de bases de tamaño completo que contiene las dos mutaciones puntuales. El casete de expresión SVE-p53 no modificado de pABS.4-p53 fue subclonado en los sitios KpnI y Sall en el sitio de clonaje múltiple de un pBluescriptSK derivado con el sitio de restricción SmaI eliminado para crear pBSKΔSma-p53. El fragmento KpnI/SmaI de 568 pb del producto de PCR de 1002 pares de bases que abarca las dos mutaciones se utilizó para remplazar el fragmento correspondiente de p53 no modificado en pBSKΔSma-p53mut14/19. Se confirmó la introducción correcta de las dos sustituciones de nucleótidos sin ningún otro cambio en la secuencia del gen p53 por secuenciación de ADN (realizado en Baseclear en Leiden, Países Bajos). El casete de expresión SVE-ps3mut14/19 de pBSKΔSma-p53mut14/19 se clonó en pABS.4 digerido con KpnI/Sall (Microbix) para crear pABS.4-p53mut14/19. La capacidad de trasactivación específica de p53 se analizó para el mutante codificado pABS.4-p53mut14/19 mediante un ensayo de transactivación específica de p53. Se transfectaron células SaOs-2 (nulas de p53) con PG13-Luc (el-Deiry y otros, *Cell* 75 (1993): 817-825) junto con pABS.4-p53mut14/19 o pABS.4 como control negativo o pABS.4-p53 como control positivo utilizando Lipofectamina PLUS (Life Technologies, Paisley, Reino Unido), según el método descrito por el fabricante. Las células se cultivaron durante 2 días y se midió la actividad de luciferasa tal como en el ejemplo 3. Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado. pABS.4-p53mut14/19 indujo la expresión de luciferasa 12 veces en comparación con pABS.4 y pABS.4-p53 indujo la expresión de luciferasa 58 veces en comparación con pABS.4. Por lo tanto, p53mut14/19 mostró una capacidad de trasactivación parcialmente conservada (20%) en comparación con p53 no modificada. La inserción del casete de expresión SVE-p53mut14/19 de pABS.4-p53mut14/19 en pBHG11 y la generación de adenovirus recombinantes AdΔ24-p53mut14/19 se realizó utilizando procedimientos análogos a los que se describen en el ejemplo 1 para AdΔ24-p53. Se espera que los adenovirus recombinantes AdΔ24-p53mut14/19, según la presente invención, muestren una potencia oncolítica mejorada en células cancerosas con elevada expresión de MDM2.

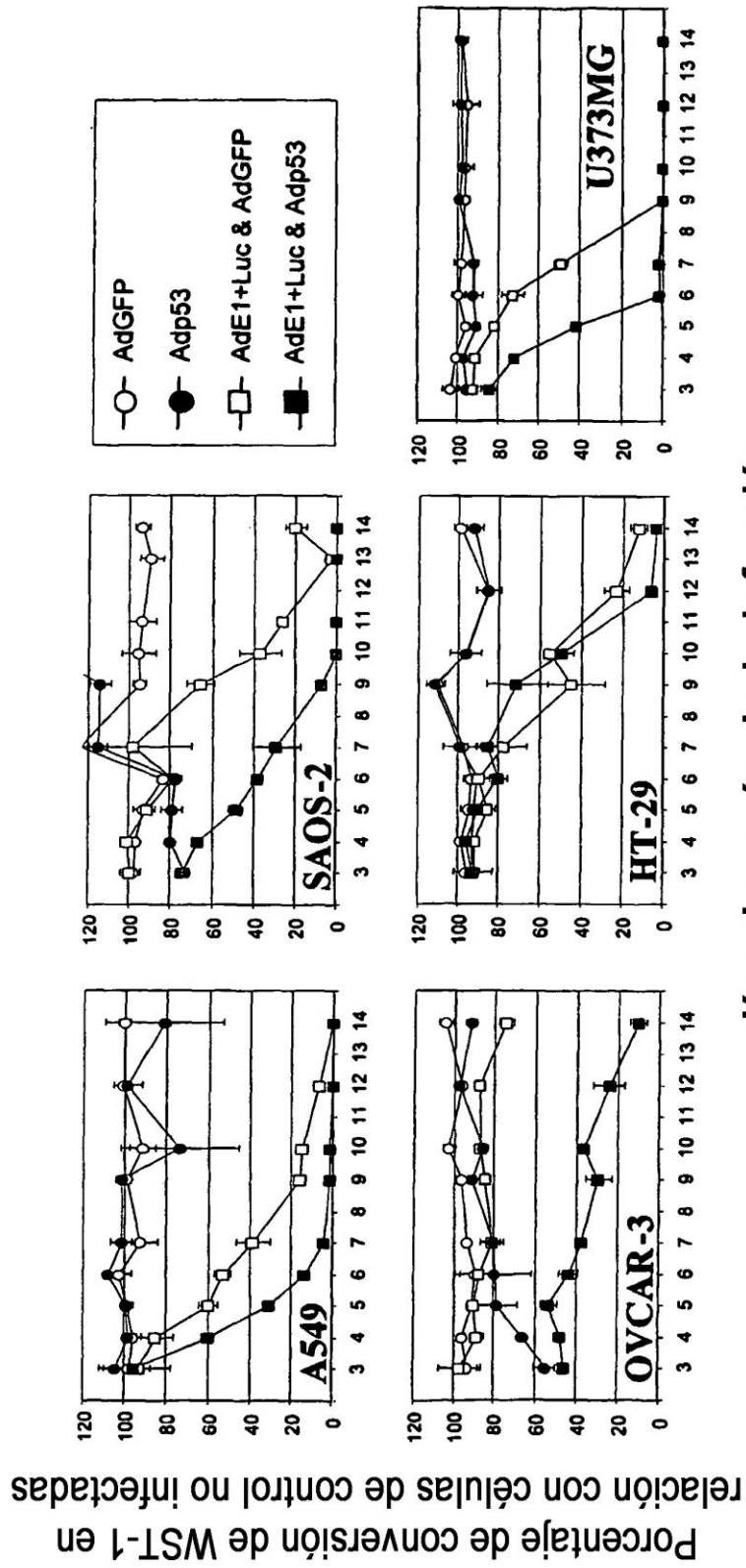
35

## REIVINDICACIONES

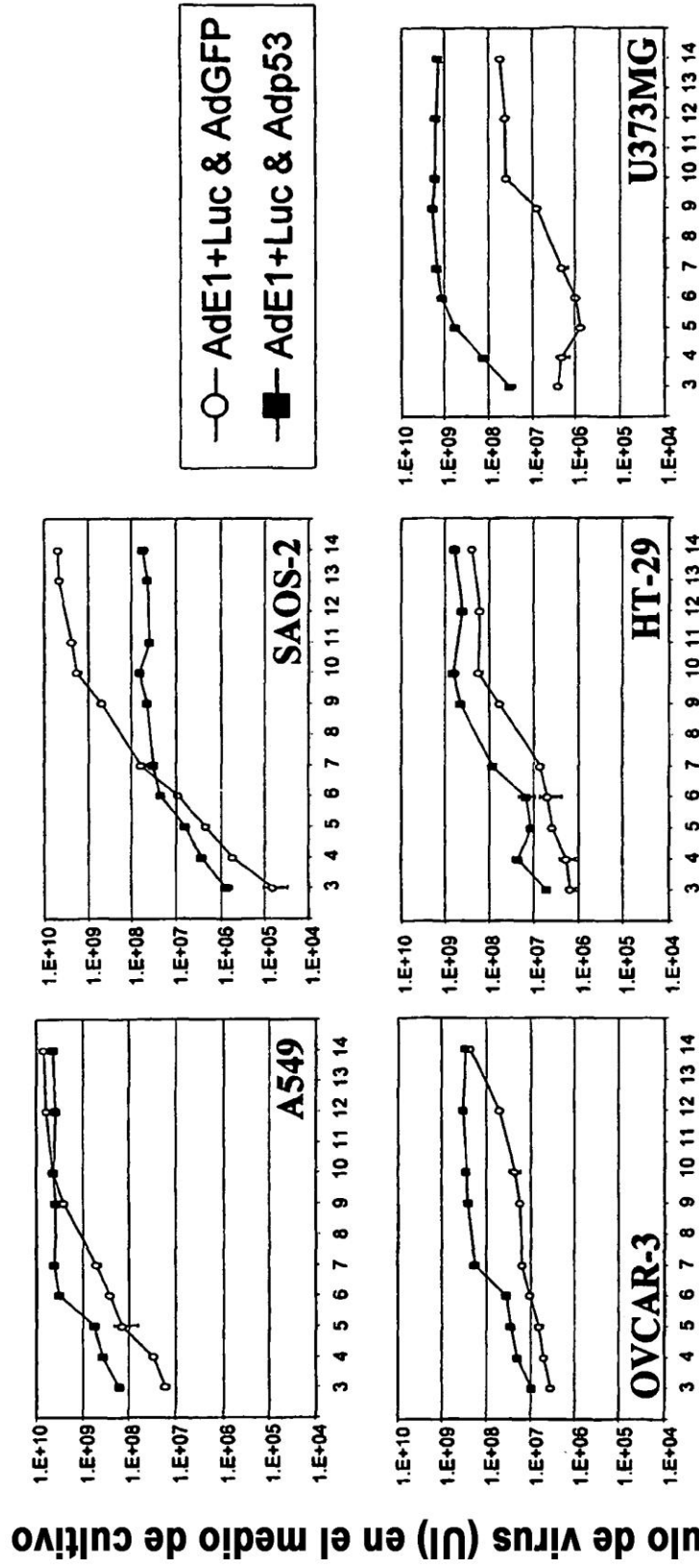
- 5 1. Adenovirus recombinante, competente para replicación, que es capaz de replicarse y que tiene capacidad lítica en las células diana, siendo dichas células defectuosas en la vía de apoptosis dependiente de p53, siendo el virus un adenovirus condicionalmente de replicación y que comprende en el genoma del mismo la secuencia que codifica una proteína de la vía de apoptosis dependiente de p53, unido funcionalmente a una o más secuencias de control de la expresión funcional en dichas células diana, y que además comprende en el genoma del mismo, como mínimo, el gen que codifica la proteína E1B-55kDa del adenovirus o un mutante de E1B-55kDa capaz de formar un complejo con p53.
- 10 2. Virus recombinante, según la reivindicación 1, en el que el virus es un adenovirus humano, preferentemente de serotipo 5.
3. Virus recombinante, según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la expresión de, como mínimo, un gen temprano de adenovirus está controlada por un promotor específico de tumor.
4. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el genoma viral comprende además el gen que codifica la proteína E1B-19 kDa del adenovirus.
- 15 5. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho genoma adenoviral comprende la región E1B completa.
6. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el genoma viral comprende uno o más, preferentemente todos, los genes de la región E4 del adenovirus que codifican las proteínas E4.
- 20 7. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el adenovirus porta una mutación en la región E1A que abarca, como mínimo, una parte del dominio CR2 de unión a pRb de E1A, preferentemente una delección que abarca los aminoácidos 122 a 129 (LTCH-EAGF) de E1A.
- 25 8. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de la vía de apoptosis dependiente de p53 se selecciona del grupo que comprende p53 o un derivado que mantiene la capacidad de inducir apoptosis dependiente de P53, p63, p73, BAX, BAK, BOK/Mtd, BCL-Xs, Noxa/APR, PIDD, p53AIP1, PUMA, KILLER/DR5, Apaf-1, PIG, BID, tBid, BAD, HRK, Bik/Nbk, BLK, mda-7 o p14ARF.
9. Virus recombinante, según la reivindicación 8, en el que la proteína de la vía de apoptosis dependiente de p53 es la proteína p53, preferentemente p53 humana, o un derivado funcional de la misma, en el que la proteína carece de un dominio de unión funcional para una proteína MDM2 humana.
- 30 10. Virus recombinante, según la reivindicación 8 ó 9, en el que la proteína es un derivado funcional de p53 humana con los aminoácidos Leu-14 y Phe-19 mutados.
11. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula diana es una célula humana, preferentemente seleccionada del grupo que comprende células cancerosas, células artríticas, células vasculares de músculo liso hiperproliferativas y células infectadas con un virus que no sea dicho virus recombinante.
12. Virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para utilizar como un medicamento.
- 35 13. Virus recombinante, según la reivindicación 12, para utilizar como un medicamento para suprimir el crecimiento celular no controlado, en particular crecimiento de células malignas, artritis, en particular artritis reumatoide o hiperplasia de células vasculares del músculo liso.
14. Procedimiento *in vitro* para lisar células diana defectuosas en la vía de apoptosis dependiente de p53, que comprende las etapas de:
- 40 infectar dichas células diana con un virus recombinante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que tiene capacidad lítica en dichas células diana;
- 45 replicar dicho virus dentro de dichas células diana, que comprende además la etapa de proporcionar, en el genoma del virus la secuencia de codificación de, como mínimo, una proteína de la vía de apoptosis dependiente de p53, siendo capaz dicha secuencia de codificación de ser expresada en las células diana tras la infección de las mismas por dicho virus y comprende además en el genoma del mismo el gen que codifica la proteína E1B-55 kDa o un mutante de E1B-55kDa capaz de formar un complejo con p53.



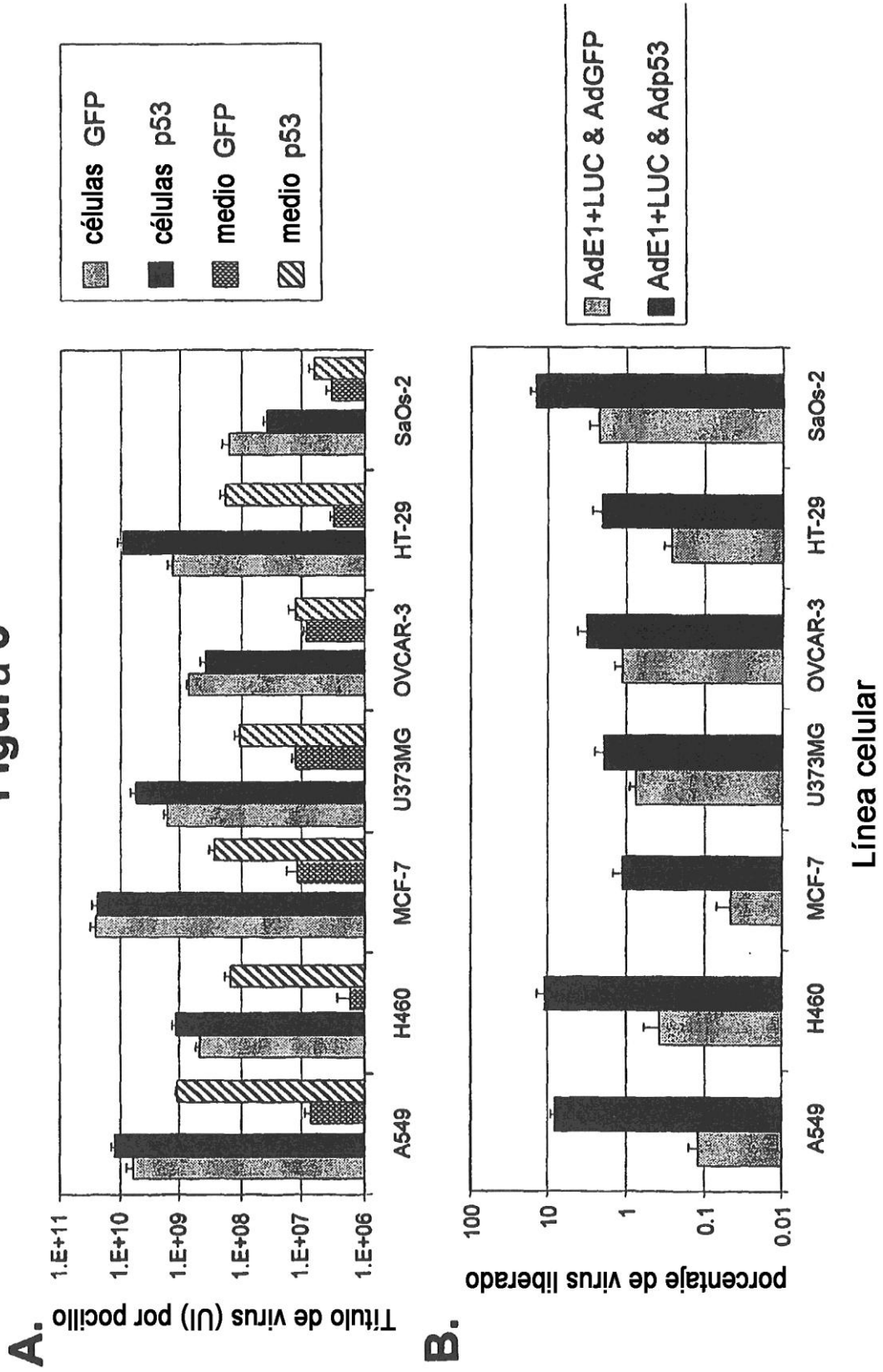
**Figura 1**



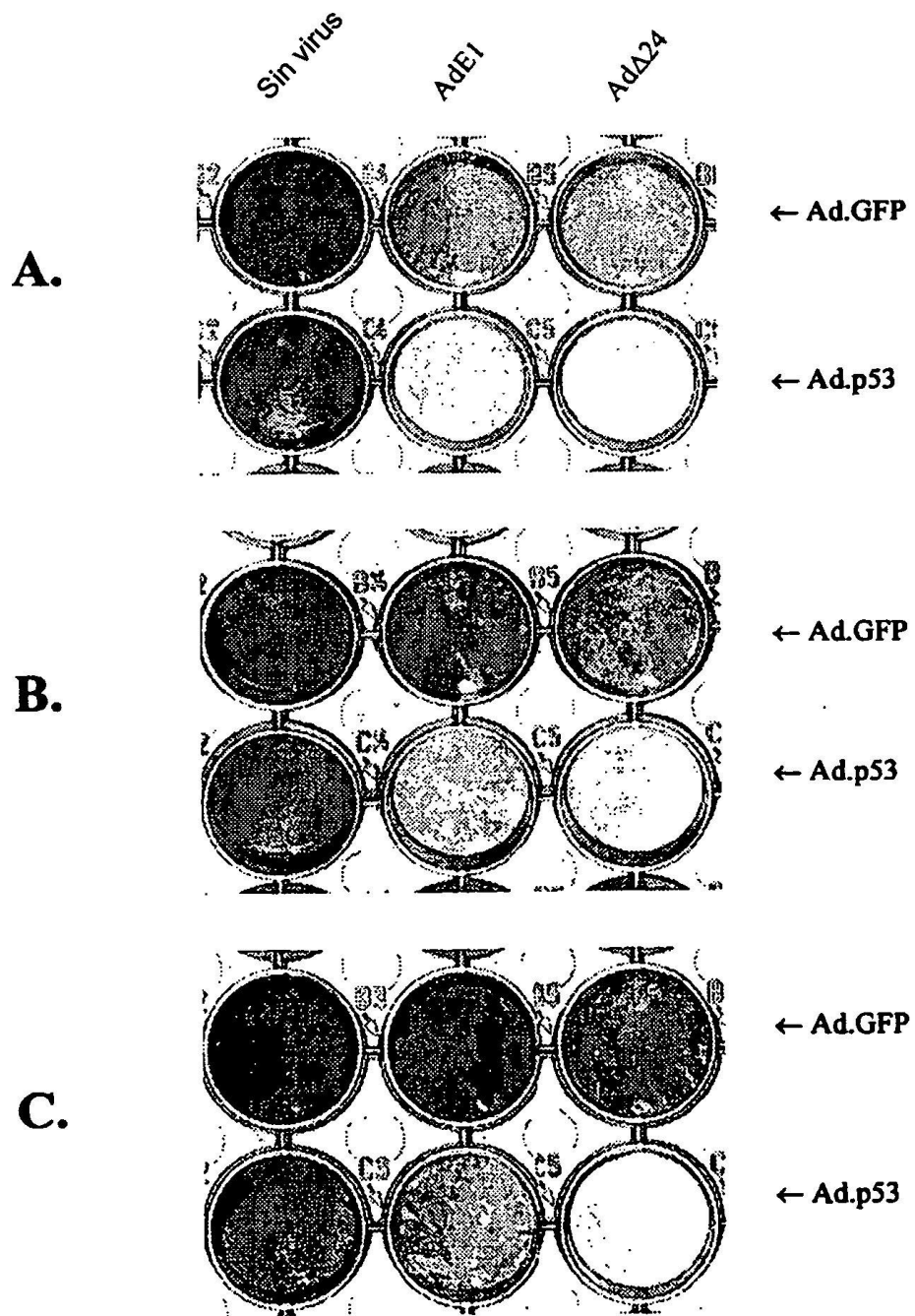
**Figura 2**



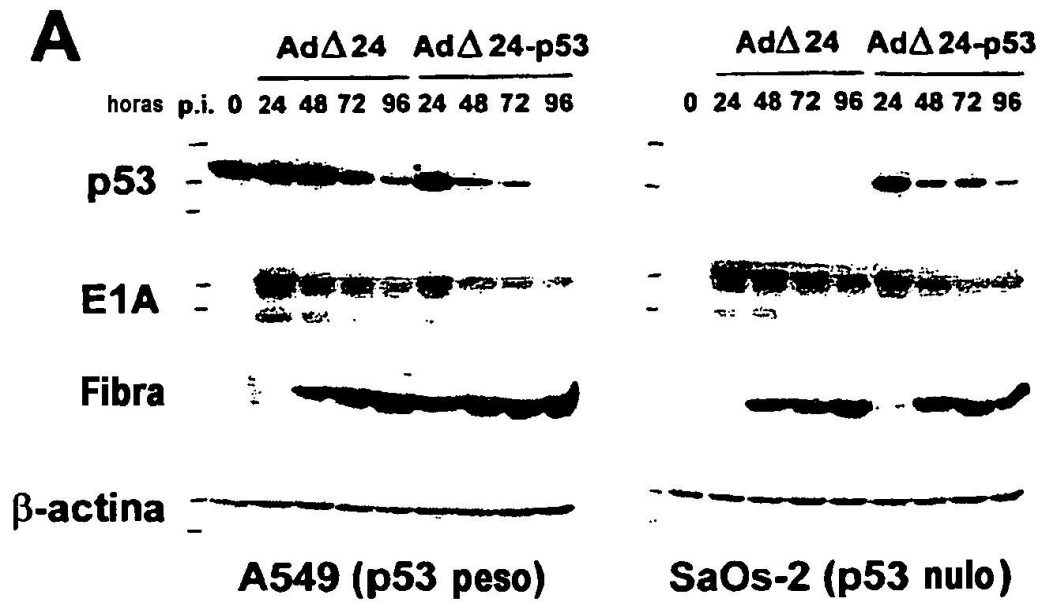
**Figura 3**



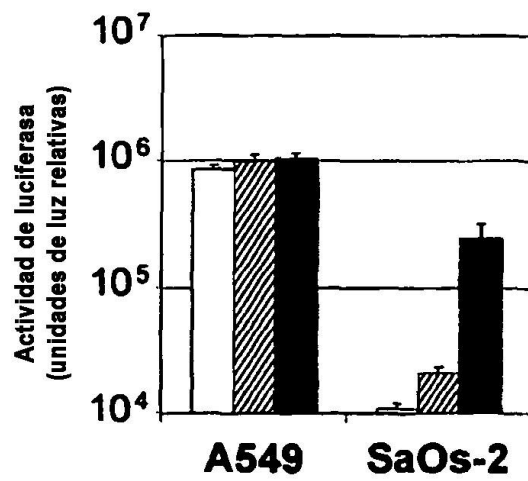
# Figura 4



# Figura 5A

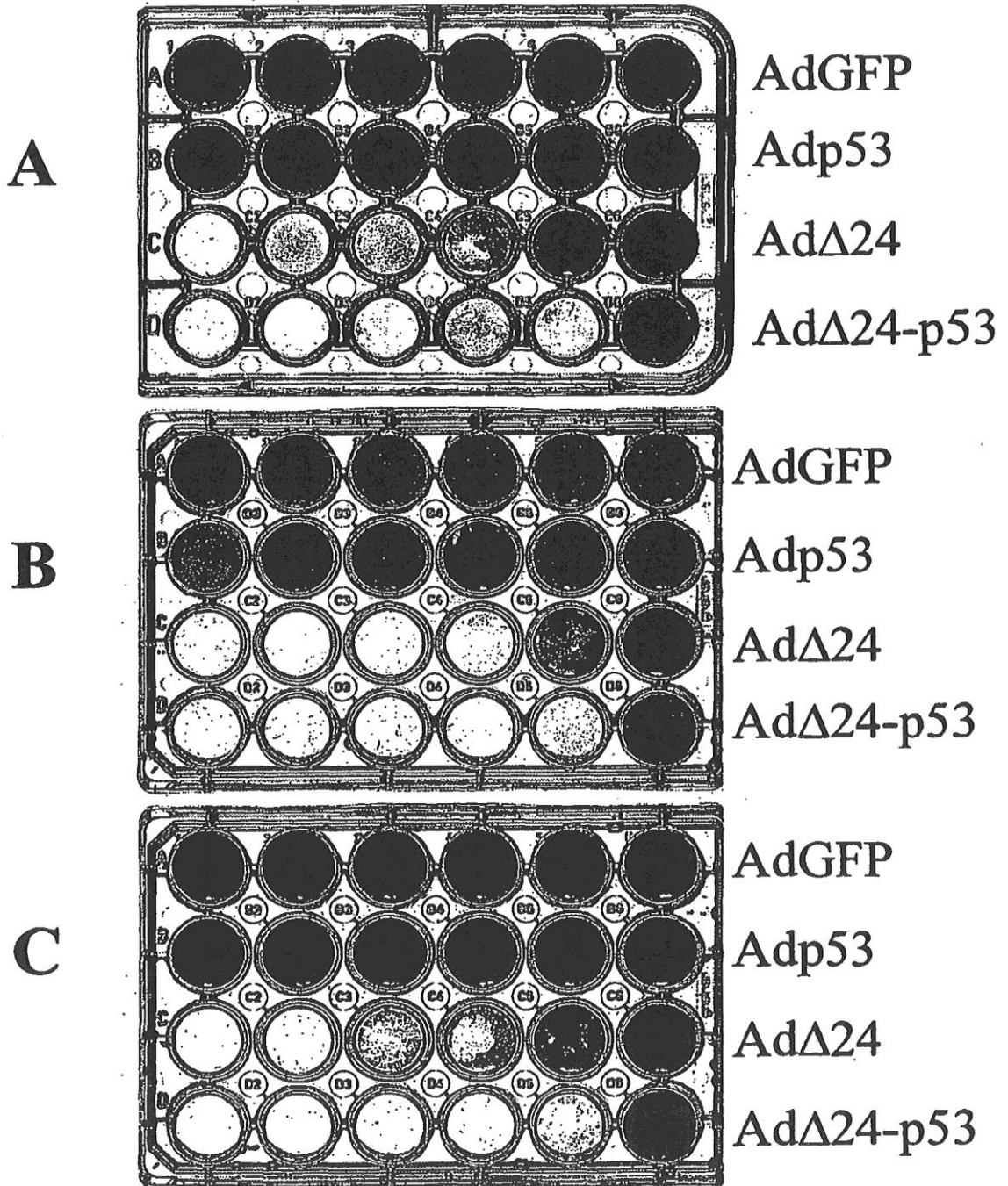


## Figura 5B

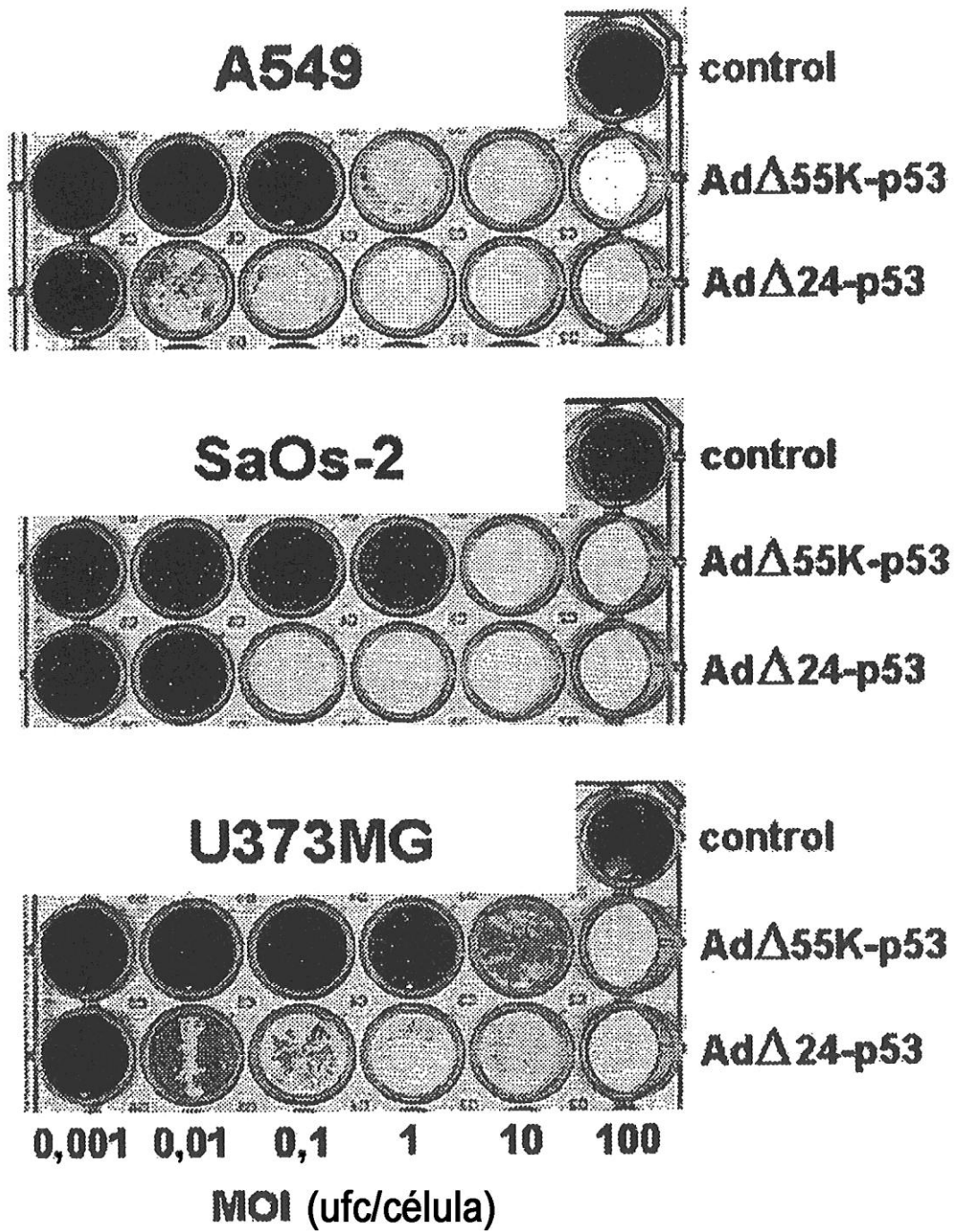


### Figura 6

MOI: 100 10 1 0,1 0,01 0 ufc/célula

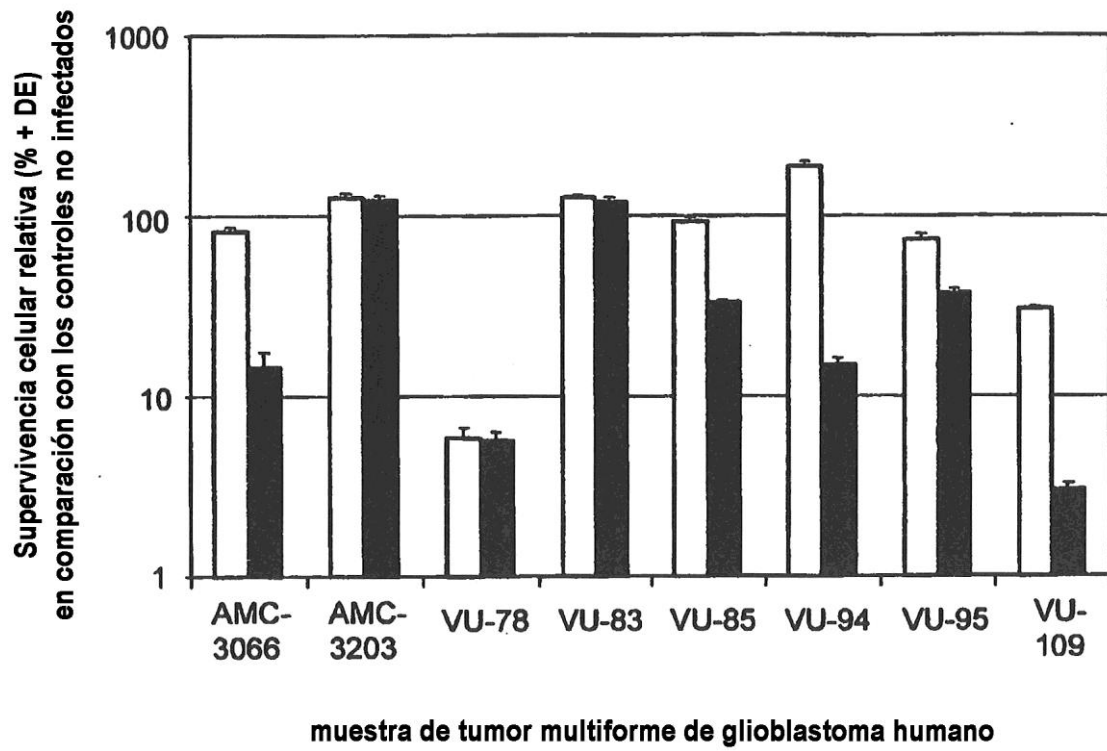


# Figura 7

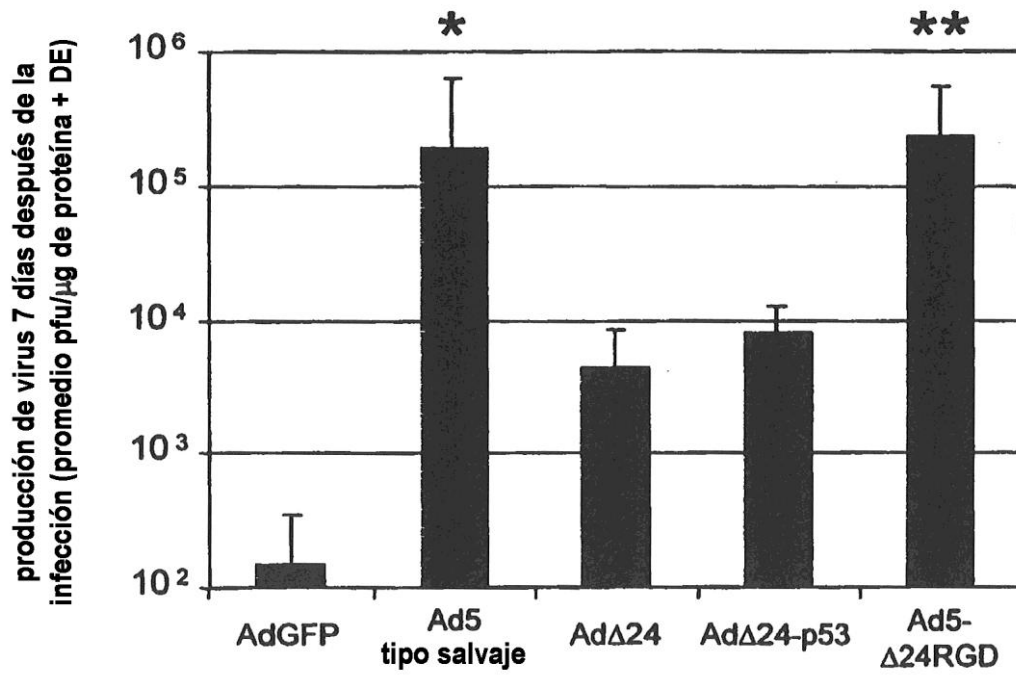




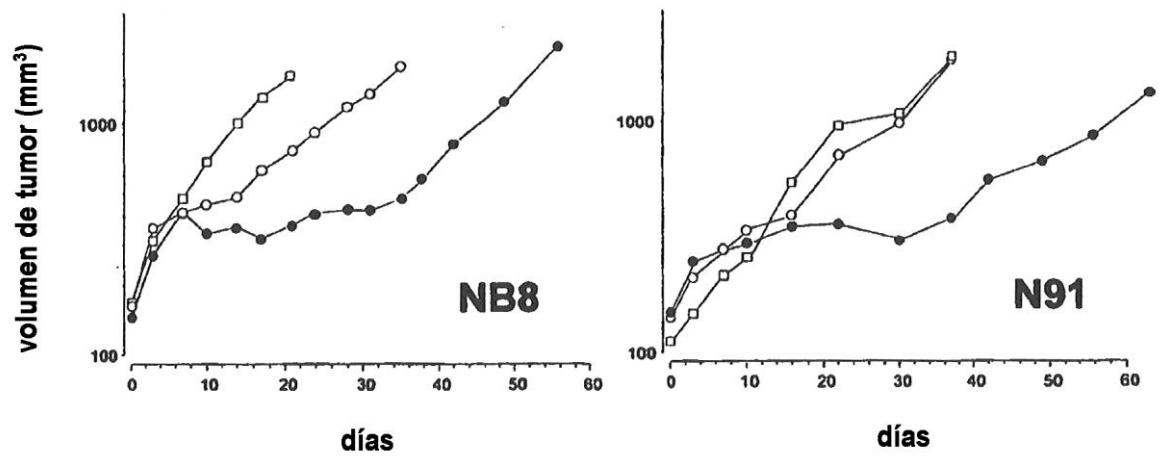
**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**

