

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 127**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2003 E 03741222 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1553178**

54 Título: **Virus oncolíticos que crecen de manera selectiva en células tumorales**

30 Prioridad:

08.07.2002 JP 2002198941

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

14.04.2014

73 Titular/es:

**ONCOLYS BIOPHARMA, INC. (100.0%)
5-12-13, Toranomon Minato-ku
Tokyo 105-0001, JP**

72 Inventor/es:

**SHIRAKIYA, YOSHIKO;
KAWASHIMA, TAKESHI;
KYO, SATORU;
FUJIWARA, TOSHIYOSHI y
TANAKA, NORIAKI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 455 127 T3

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

DESCRIPCIÓN

Virus oncolíticos que crecen de manera selectiva en células tumorales

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un adenovirus que muestra un efecto antitumoral replicando un polinucleótido, que está contenido en el virus, en células tumorales y un agente anticáncer que comprende el virus.

10 **Técnica precedente**

Hoy día, la terapia genética se lleva a cabo como un procedimiento para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, si en la terapia genética se introduce un gen en un tejido enfermo o similar con un vector vírico incapaz de replicarse, el gen se puede aplicar únicamente a las regiones que están alrededor de las células diana, teniendo en consideración la seguridad del cuerpo humano. También, en la práctica actual de terapia genética, el efecto terapéutico satisfactorio no se puede conseguir debido a la baja eficacia de la transferencia génica.

Se sabe que la actividad de la telomerasa a menudo está aumentada en las células malignas transformadas o en las cepas de células inmortalizadas mientras que la actividad de la telomerasa es difícil de encontrar en las células somáticas normales, excluyendo las células de la línea germinal, las células de linaje sanguíneo y las células madre epiteliales.

Bajo estas circunstancias, es un objetivo principal de la presente invención permitir que un virus crezca en las células tumorales utilizando la telomerasa activada en estas para de esta manera conseguir la muerte de las células tumorales eficazmente.

El documento CN1339584A desvela un adenovirus, o vector adenovírico, que tiene la capacidad de infectar y replicarse selectivamente en células que tienen actividad telomerasa. El virus o vector comprende la subunidad promotora catalítica de telomerasa humana (hTERT) o el promotor del componente ARN génico de la telomerasa (hTERC) que controlan la expresión de un gen temprano inmediato.

El documento WO 00/46355 desvela los elementos reguladores que promueven la transcripción en células que expresan la telomerasa transcriptasa inversa (TERT). Se describen virus oncolíticos, en los que se coloca bajo el control del promotor TERT una toxina o un elemento genético esencial para la replicación vírica. Como resultado, el virus se replica preferentemente en células que expresan TERT, y destruyen selectivamente las células cancerosas.

El documento WO 01/73093 desvela vectores adenovíricos capaces de replicarse que comprenden un primer y un segundo gen cotranscritos que están bajo el control transcripcional de un elemento regulador de la transcripción heterólogo, específico de una célula diana (TRE) El segundo gen está bajo el control traduccional de un sitio interno de entrada en el ribosoma. Los vectores producen la replicación de virus específicos de células diana en aplicaciones tales como terapia contra el cáncer y terapia genética.

Hiyama y col, Neoplasia 3(1), 17-26, 2001 examinaron la expresión de hTERT a nivel celular en materiales clínicos seccionados utilizando inmunohistoquímica, y luego compararon estos resultados con los mismos especímenes en los que también se habían analizado los niveles de actividad de telomerasa.

Holt y Shay, J. Cellular Physiology 180:10-18, 1999, revisan el papel de la telomerasa en la proliferación celular y el cáncer. Zhang y col, Cancer Res. 62(13), 3743-3750, 2002 informan de la identificación del promotor humano uroplakin II y su utilización en la construcción de una variante de adenovirus específico del urotelio CG8840 que elimina tumores establecidos en la vejiga en combinación con docetaxel. Kim y col, Cancer Letters 180(1), 23-32, 2002 describe los efectos antitumorales de un adenovirus recombinante YKL-1001 que se replica condicionalmente en células cancerosas pequeñas humanas vivas que producen alfa-fetoproteína.

55 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra un dibujo esquemático de la estructura de un virus oncolítico que se replica selectivamente en células tumorales. Se ha insertado un casete de replicación con consiste en el promotor hTERT, gen E1A, secuencia IRES y gen E1B en la región génica E1 de la que carecen los virus vectores que no tienen la capacidad de replicarse.

60 La Fig. 2 muestra la comparación de las actividades de la telomerasa en células cancerosas humanas y células normales.

La Fig. 3 muestra la expresión de los ARNm E1A y E1B y las proteínas después de la infección con TRAD en las células cancerosas humanas y en células normales.

65 La Fig. 4 muestra una replicación intracelular del virus después de la infección con TRAD en células cancerosas humanas y en células normales.

La Fig. 5 presenta las fotografías que muestran, tiñendo con Coomassie azul brillante, la citotoxicidad producida

por el TRAD en células cancerosas humanas y en células normales.

La Fig. 6 presenta fotografías de microscopía que muestran la citotoxicidad producida por TRAD en células cancerosas humanas y en células normales.

5 La Fig. 7 presenta gráficos que muestran por medio del ensayo XTT la citotoxicidad producida por el TRAD en células cancerosas humanas y en células normales.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral producido por la administración intratumoral, local de un vector adenovírico, sin capacidad de replicarse, que expresa el gen p53 en un experimento que utiliza ratones desnudos y células H358 humanas de cáncer de pulmón.

10 La Fig. 9 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral producido por la administración intratumoral, local de TRAD en un experimento utilizando ratones desnudos y células SW620 humanas de cáncer de intestino grueso.

Divulgación de la invención

15 Los presentes inventores han descubierto por primera vez que, infectando células cancerosas con un virus que tiene un promotor telomerasa y capacidad de replicación, es posible permitir que el virus se replique en las células cancerosas produciendo la muerte de las mismas. Así, se ha conseguido la presente invención.

20 En consecuencia, la presente invención proporciona un polinucleótido que comprende un promotor hTERT, un gen de adenovirus E1A, una secuencia IRES y un gen de adenovirus E1B en este orden, en el que el promotor hTERT consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 4, el gen de adenovirus E1A consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1, la secuencia IRES consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 3, y el gen de adenovirus E1B consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 2.

La invención también proporciona:

- 25
- un adenovirus que comprende el polinucleótido de la invención;
 - una composición farmacéutica que comprende el adenovirus de la invención como principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
 - 30 - un adenovirus de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal como terapia;
 - un adenovirus de la invención para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer que expresa hTERT;
 - una composición farmacéutica de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal como terapia; y
 - 35 - una composición farmacéutica de la invención para su uso en un procedimiento para tratar un cáncer que expresa hTERT.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se caracteriza por producir la muerte de las células cancerosas infectando las células cancerosas con un virus que tiene un promotor de telomerasa y capacidad de replicación y permitiendo al virus crecer en las células cancerosas, basándose en el hallazgo de que una amplia variedad de células cancerosas tienen actividad telomerasa.

45 El virus que se utiliza en la presente invención es un adenovirus. Entre las especies de adenovirus, el adenovirus tipo 5 es particularmente preferido desde el punto de vista, por ejemplo, de su facilidad de uso.

50 Los virus tienen genes tempranos (E) y genes tardíos (T) implicados en su replicación de ADN. El gen E1 codifica una proteína implicada en la regulación de la transcripción del genoma vírico. Se sabe que el gen E1 está compuesto de E1A, E1B y otros elementos. La proteína E1A codificada por el gen E1A activa la transcripción de un grupo de genes (E1B, E2, E4, etc.) necesarios para la producción de virus infecciosos. La proteína E1B codificada por el gen E1B ayuda a la acumulación del ARNm del gen tardío (gen L) en el citoplasma de la célula huésped infectada y de esta manera inhibe la síntesis proteica de la célula huésped. Por tanto, la proteína E1B promueve la replicación vírica. Las secuencias del gen E1A y del gen E1B del adenovirus se muestran en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2, respectivamente.

55 En la presente invención, se utiliza un gen E1 que tiene un gen E1A de adenovirus, una secuencia IRES y un gen E1B de adenovirus, en este orden (es decir, un gen E1 en el que se ha insertado una secuencia IRES entre el gen E1A y el gen E1B). Con el uso de tal gen E1, la capacidad de replicación del virus será alta cuando se infecte una célula huésped con el virus.

60 Siempre y cuando se pueda conseguir el objetivo de la invención, al menos se puede insertar un nucleótido en al menos un sitio que se selecciona de entre (a) entre la secuencia IRES y el gen E1A, (b) entre la secuencia IRES y el gen E1B, (c) corriente arriba del gen E1A y (d) corriente abajo del gen E1B. Siempre y cuando se pueda conseguir el objetivo de la invención, al menos uno, preferentemente varios nucleótidos se pueden sustituir, eliminar, insertar o
65 añadir en el gen E1A, la secuencia IRES, el gen E1B o el gen E1.

“Secuencia IRES” es una señal de inicio de síntesis proteica específica para picornavirus. Se cree que esta secuencia sirve como sitio de unión al ribosoma porque contiene una secuencia complementaria a la secuencia del extremo 3' del ARN ribosómico 18S. Se sabe que el ARNm derivado de picornavirus se traduce por medio de esta secuencia.

5 La eficacia de traducción de la secuencia IRES es alta. Incluso desde el medio del ARNm, la síntesis proteica se lleva a cabo en una estructura cap de manera no dependiente. Por lo tanto, en el virus de la presente invención, tanto el gen E1A como el gen E1B que se localizan corriente abajo de la secuencia IRES se traducen independientemente por un promotor a partir de la telomerasa humana. La secuencia IRES se muestra en la SEC ID N° 3.

15 En la presente invención el gen E1 tiene un promotor de la telomerasa humana corriente arriba del mismo, debido a tal promotor es capaz de promover la replicación del virus de la invención en células cancerosas que tienen actividad telomerasa. El promotor es el promotor hTERT.

20 El hTERT es un gen que codifica la transcriptasa inversa de la telomerasa humana. Se han confirmado varias secuencias de unión al factor de transcripción en una región de 1,4 kpb corriente arriba del extremo 5' de este gen. Esta región se cree que es el promotor hTERT. En particular, una secuencia de 181 pb localizada corriente arriba del sitio de inicio de la traducción es una región core importante para la expresión del gen corriente abajo.

25 En la presente invención se utiliza una secuencia que comprende esta región core como el promotor para la telomerasa humana. Se utiliza una secuencia corriente arriba de aproximadamente 378 pb que contiene la región core completamente. Se ha confirmado que esta secuencia de aproximadamente 378 pb es equivalente en eficacia de expresión génica a la región core de 181 pb sola. La secuencia del promotor hTERT se muestra en la SEC ID N° 4.

30 Un gen que tiene el promotor de la telomerasa de la invención y el gen E1 de la invención (un gen que comprende el gen E1A, la secuencia IRES y el gen E1B) se pueden obtener por técnicas convencionales de manipulación genética.

35 Se puede utilizar como gen E1, un gen E1 de un adenovirus conocido que tenga ese gen. De manera alternativa, el gen E1A y el gen E1B se pueden amplificar a partir de células que expresen el gen E1 (preferentemente, células 293 que expresen el gen E1 o similares) por medio de RT-PCR y/o ADN-PCR utilizando cebadores tales como E1A-S, E1A-AS, E1B-S y E1B-AS. Si es necesario, se confirman sus secuencias utilizando un procedimiento convencional como clonación TA. Luego, los fragmentos de ADN E1A y E1B se pueden recortar utilizando una enzima de restricción conocida tal como EcoRI.

40 El E1A y E1B se pueden insertar en un vector conocido tal como pIRES por técnicas de manipulación genética convencionales para preparar de esa manera la secuencia E1A-IRES- E1B en el vector. Posteriormente, se puede insertar la secuencia promotora hTERT que se cortó con enzimas de restricción tales como MluI y BhlII en el sitio XhoI o similar localizado corriente arriba de E1A.

45 Si es necesario, puede eliminarse un promotor de citomegalovirus (CMV) que esté contenido en un vector conocido tal como pShuttle con enzimas de restricción tales como MfeI y NheI; luego, se puede insertar una secuencia recortada del pHERT- E1A-IRES- E1B con las enzimas de restricción NheI y NotI en el sitio (el vector resultante se denomina “pSh-hAIB”).

50 A partir del resultante pSh-hAIB, se puede recortar una secuencia que comprenda las porciones necesarias (incluyendo el promotor hTERT, el gen E1A, la secuencia IRES y el gen E1B) con enzimas de restricción tales como I-CeuI y P1-SceI, y luego insertarse en un ADN vírico tal como el ADN vírico Adeno X, utilizando un kit comercial tal como el Sistema de Expresión Adeno X (Clontech) (el ADN resultante se denomina “AdenoX-hAIB”).

55 La secuencia descrita anteriormente que comprende el promotor hTERT, el gen E1A, la secuencia IRES y el gen E1B se puede insertar en cualquier sitio de un gen vírico siempre y cuando le efecto de la presente invención se consiga. Por ejemplo, en adenovirus para terapia genética en los que se ha eliminado el gen E1, la secuencia descrita anteriormente se prefiere que se inserte en el sitio de la eliminación.

60 Es posible linealizar el AdenoX-hAIB con una enzima de restricción conocida tal como PacI y luego transfectarlo en células cultivadas tales como las células 293, para preparar de esta manera un adenovirus infeccioso recombinante (al virus resultante se le llama a veces “el virus de la presente invención” o “TRAD”). El procedimiento de transfección no está particularmente limitado. Desde el punto de vista de la eficacia, pueden ser preferidos los procedimientos tales como el procedimiento del fosfato cálcico o la electroporación.

65 El virus de la presente invención obtenido de esa manera se puede replicar por procedimientos convencionales para replicación vírica, por ejemplo, infectando con el virus células huésped tales como las células 293.

El virus de la presente invención se puede utilizar como un agente anticáncer. El agente anticáncer se puede utilizar no solo para tratar cánceres sino también para prevenir la recaída postoperatoria de los cánceres, prevenir la metástasis del cáncer y/o para la profilaxis de los cánceres.

5 Los tipos de cánceres a los que se aplica el agente anticáncer de la invención no están particularmente limitados. El agente anticáncer es aplicable a cualquier tipo de cáncer. Por ejemplo, el agente anticáncer es eficaz para cánceres de estómago, intestino grueso, pulmón, hígado, próstata, páncreas, esófago, vejiga, vesícula/conductos biliares, mama, útero, tiroides, ovario, etc., así como a tumores cerebrales y osteosarcoma. Entre todos ellos, el agente anticáncer es especialmente eficaz para tumores sólidos.

10 El agente anticáncer de la invención se puede aplicar en los sitios enfermos tal cual. De manera alternativa, el agente anticáncer se puede introducir en seres humanos (células diana y órganos) por cualquier procedimiento conocido, por ejemplo por inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea; por inhalación a través de la cavidad nasal, la cavidad oral o el pulmón; por administración oral; por administración en forma de supositorio; y por administración en forma de medicamento externo.

15 El virus de la invención se puede tratar, por ejemplo, por un procedimiento de liofilización para facilitar el manejo y luego se puede usar solo, o preparado en composiciones farmacéuticas mezclándolo con vehículos conocidos farmacéuticamente aceptables tales como excipientes, agentes de carga, aglutinantes, lubricantes; o aditivos conocidos (incluyendo tales como tampones, agentes isotónicos, agentes quelantes, agentes colorantes, conservantes, aromatizantes, agentes saborizantes y agentes edulcorantes).

20 El agente anticáncer de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral dependiendo de la forma del agente, por ejemplo agentes para administración oral tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, píldoras, líquidos, jarabes, etc. y agentes de administración parenteral tales como inyecciones, medicamentos externos, supositorios, gotas oftálmicas, etc. Preferentemente, se pueden enumerar la inyección local en el músculo o en la cavidad abdominal, o la inyección intravenosa.

30 Los niveles de dosis se seleccionan apropiadamente dependiendo del tipo de principio activo, la vía de administración, la diana de administración, y la edad, el peso corporal, el sexo, los síntomas y otras afecciones del paciente. Normalmente, los niveles de dosis se pueden seleccionar de forma que el virus de la invención (el principio activo) se administre a una dosis diaria de aproximadamente 10^6 - 10^{11} UFP, preferentemente aproximadamente 10^9 - 10^{11} UFP. Esta cantidad se puede administrar una vez al día, o se puede dividir en varias partes y administrarse varias veces al día.

35 Cuando se administra el virus de la invención, también es posible utilizar un inmunosupresor conocido o similar para suprimir la inmunidad del cuerpo vivo para facilitar de esta manera la infección vírica.

40 Además el virus de la invención se puede utilizar en conjunción con al menos un agente anticáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en virus incapacitados para la replicación (tales como los virus que comprenden el gen p53) que se utilizan en la terapia genética convencional, agentes anticáncer conocidos y radiación.

45 El virus de la invención que infecta el cuerpo vivo (células cancerosas o tejidos del cáncer) es capaz de replicarse en las células cancerosas y causar la muerte de esas células. Por medio de esta muerte celular, el virus de la invención puede tratar cánceres, inhibir el crecimiento de las células tumorales, y prevenir la metástasis de las células cancerosas.

50 Se cree que hay una posibilidad extremadamente baja de que el agente anticáncer de la invención produzca efectos secundarios por las razones que se describen posteriormente. Por lo tanto, se puede decir del agente anticáncer de la invención que es una preparación segura.

(1) Hay muy poca actividad telomerasa en las células somáticas normales, y además es difícil que el adenovirus por sí mismo sea infeccioso para células en suspensión tal como las células hematopoyéticas. Por lo tanto, cuando se utiliza un adenovirus en la presente invención, se obtiene aún mayor selectividad por los tipos de tumor.

(2) Como el virus de la presente invención tiene capacidad de replicación, es posible utilizar este virus a una concentración menor que la de los virus incapacitados para replicarse convencionales que se utilizan en la terapia genética convencional.

(3) Incluso cuando el virus de la invención se ha administrado en exceso, se produce una acción antivírica funcional por medio de la reacción inmunitaria ordinaria del cuerpo vivo.

Ejemplos

65 A partir de ahora, se proporcionarán ejemplos con el fin de ilustrar la presente invención con mayor detalle. No es necesario decir, que la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1

<Preparación de TRAD>

5 Un gen E1A de 899 pb se amplificó a partir del ARN extraído de células 293 por RT-PCR utilizando los cebadores específicos (E1A-S: SEC ID N° 5; E1A-AS: SEC ID N° 6). Un gen E1B de 1.823 pb se amplificó a partir de un ADN extraído de células 293 por ADN-PCR utilizando los cebadores (E1B-S: SEC ID N° 7; E1B-AS: SEC ID N° 8).

10 Estos productos de la PCR se sometieron a clonación TA (Kit de Clonación TA de Promotor Doble; Invitrogen) para confirmar de esa manera sus secuencias. Luego, los fragmentos de ADN de 899 pb (E1A) y de 1.823 pb (E1B), respectivamente, se recortaron con la enzima de restricción EcoRI.

15 Se insertaron el E1A y E1B en el sitio MluI y en el sitio Sall, respectivamente, del vector pIRES (Clontech) en la orientación normal (E1A-IRES- E1B).

Una secuencia promotora hTERT de 455 pb que se había recortado con las enzimas de restricción MluI y BglII se insertó en el sitio XhoI localizado corriente arriba del E1A de E1A-IRES- E1B (pH-TERT- E1A-IRES- E1B).

20 El promotor de citomegalovirus (CMV) que estaba contenido en el vector pShuttle se retiró por tratamiento con las enzimas de restricción MfeI y NheI. Luego, se insertó en ese sitio una secuencia de 3.828 pb que se había recortado del pH-TERT- E1A-IRES- E1B utilizando las enzimas de restricción NheI y NotI (pSh-hAIB).

25 Se recortó una secuencia de 4.381 pb del pSh-hAIB utilizando las enzimas de restricción I-CeuI y P1-SceI, y se insertó en el ADN vírico Adeno X del Sistema de Expresión Adeno X (Clontech) (AdenoX-hAIB). Este AdenoX-hAIB se trató con la enzima de restricción PacI para linealización y luego se transfectó en células 293 por el procedimiento del fosfato cálcico. Así se prepararon adenovirus recombinantes infecciosos (TRAD). Un dibujo esquemático del TRAD se muestra en la Fig. 1.

Ejemplo 2

30 <Comparación de las actividades de Telomerasa en Células Cancerosas y Células Normales>

35 Se extrajo el ARN de los siguientes 10 tipos de células utilizando ARNzol (Cinna/Biotech): células humanas de cáncer de pulmón (A549, H226Br y H1299); células humanas de cáncer de intestino grueso (SW620, DLD-1 y LoVo); células embrionarias humanas de riñón 293; células de endotelio vascular umbilical humanas HIVEC inmortalizadas por la introducción del gen SV40; y células humanas de fibroblastos normales (WI38 y NHLF). El ARN resultante se sometió a transcripción (RT)-PCR cuantitativa inversa en tiempo real utilizando el kit Light Cycler ADN TeloTAGGG (Roche Molecular Biochemicals), y a continuación se compararon los niveles de expresión en las células respectivas. Los resultados se muestran en la Fig. 2.

40 Cuando se compararon los niveles de expresión tomando el nivel en las células A549 (que habían mostrado la expresión más alta) como 1,0, se observaron expresiones génicas de 0,18 a 1,00 en las células cancerosas (tales como A549, H226Br, H1299, SW620, DLD-1, Lovo) y células 293, mientras que no se detectó expresión en células inmortalizadas HuVEC y células normales (tales como WI38, NHLF).

Ejemplo 3

50 <Expresión de ARNm E1A y E1B y Proteínas después de la Infección con TRAD en Células Cancerosas Humanas y Células Normales>

Se cultivaron *in vitro* células humanas del cáncer de intestino grueso SW620 y las células fibroblastos normales humanas WI38. Luego, cada célula se infectó con TRAD a concentraciones de MOI (multiplicidad de infección) 0,1 y 1, y a continuación se recuperó el ARN 36 horas después. Como control positivo, se utilizaron las células 293.

55 El ARN recuperado se transcribió inversamente utilizando el Kit GeneAmp RNA PCR Core. El ADN resultante se amplificó durante 30 ciclos en el Ciclador Térmico del Sistema PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystems) utilizando los cebadores para el gen E1A y el gen E1B. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis sobre gel de agarosa al 1,2% y se tiñeron con bromuro de etidio para visualizar de esta manera las bandas (los paneles superiores de la Fig. 3A). Las intensidades de las bandas se midieron con un analizador de imagen, se determinaron cuantitativamente utilizando GAPDH como control interno y luego se mostraron en gráficos (el panel inferior de la Fig. 3 A).

65 Se cultivaron *in vitro* células humanas SW620 de cáncer de intestino grueso y células humanas normales WI38. Luego, cada célula se infectó con TRAD a concentraciones de MOI de 0,1 y 1. Tras 48 horas, se recuperaron las células adherentes y se hicieron reaccionar en una solución de lisis durante 30 minutos, y a continuación se centrifugaron. Se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante resultante. En resumen, el sobrenadante

se sometió a electroforesis con gel de poliacrilamida al 12% y se transfirió a una membrana. Luego, se llevó a cabo un análisis de transferencia de Western con el anticuerpo anti adenovirus 5 E1A (PharMingen International). Los resultados se muestran en la Fig. 3B.

- 5 Mientras que se observó claramente una expresión fuerte del gen E1A (502 pb) y del gen E1B (543 pb) como resultado de la infección por TRAD en las células SW620 cancerígenas, solo se observó una expresión débil en células normales WI38 (Fig. 3A). En las células de control positivo 293, se observó una expresión media de estos genes.
- 10 Los resultados de la transferencia de Western revelaban que la expresión de la proteína E1A aumentaba en SW620 según aumentaba la concentración de TRAD desde un MOI de 0,1 a 1 (Fig. 3B). Por otra parte, la expresión de la proteína E1A se detectó poco en WI38 incluso cuando el TRAD se utilizó a una MOI de 1.

Ejemplo 4

- 15 <Examen de la Replicación Vírica Intracelular tras la Infección con TRAD en Células Cancerosas Humanas y Células Normales>

20 Se infectaron células cancerosas humanas (SW620 y H1299) y células humanas normales (WI38 y NHLF) con TRAD a MOI de 1 durante 2 horas a 37 °C. Luego, se descargó el caldo de cultivo que contenía el TRAD. Después de lavarse las células con un medio de cultivo recién preparado, se les añadió más medio de cultivo recién preparado. Inmediatamente después (es decir, en el día 0), se recuperaron las células con un rascador y se sometieron a congelación descongelación repetidas. Luego, se suspendieron en 1 ml de un caldo de cultivo. Además, los virus se recuperaron los días 1, 2, 3, 5 y 7 de la misma manera, y a continuación se hizo la medición del título vírico. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

25 En las células normales WI38 y NHLF, el TRAD aumento desde 10^2 UFP el día 1 a aproximadamente 10^5 UFP el día 3 mostrando un crecimiento de 100 a 1.000 veces. Por otro lado, en las células cancerosas SW620 y H1299, el TRAD aumentó a 10^7 - 10^8 UFP mostrando un crecimiento de 10^2 a 10^6 veces. Por lo tanto, el crecimiento vírico específico en células cancerosas quedó confirmado.

Ejemplo 5

- 35 <Actividad Citotóxica del TRAD en Células Cancerosas Humanas y Células Normales>

40 Se pusieron en placas cinco tipos de células humanas cancerosas (SW620, H1299, A549, DLD-1 y H226Br) en placas de 24 pocillos a $6-8 \times 10^4$ células/ pocillo, y se colocaron en placas de 24 pocillos dos tipos de células humanas normales (WI38 y NHLF) a $2-4 \times 10^4$ células / pocillo. Después de 24 horas se infectaron con TRAD a unas MOI de 0,01, 0,1, 1, 2 y 5. Noventa y seis horas después de la infección, se observaron cambios morfológicos en las células SW620, DLD-1 y NHLF por microscopía. Además se descargó todo el caldo de cultivo de todas las células. Luego, las células viables se tiñeron con azul brillante de Coomasie, y se tomaron imágenes macroscópicas con un escáner.

45 Se colocaron en placas las SW620 y H1299 a 10^4 células / pocillo y se colocaron las NHLF a 5×10^3 células / pocillo, respectivamente en placas de 96 pocillos. Las células se infectaron con TRAD a unas MOI de 0 (células no infectadas), 0,01, 0,1 y 1. Luego, se midió el número de células viables por el ensayo XTT los días 1, 2, 3, 5 y 7. Se determinó el recuento de células viables cada cuatro pocillos. Teniendo en cuenta las células no infectadas como 1.0, se representaron los recuentos de las otras células en gráficos en medias +/- DS. Los resultados respectivos se muestran en las Figs. 5, 6 y 7.

50 En las células cancerosas SW620, H1299, A549, DLD-1 y H226Br, los recuentos celulares disminuyen y las áreas teñidas en azul se reducen de manera dependiente a la concentración de TRAD. Por otro lado, en células normales WI38 y NHFL, no se reconoció ningún descenso remarcable en el número de células viables teñidas con azul (Fig. 5).

55 En la observación al microscopio, las células SW620 y DLD-1 que se despegaron del fondo de la placa, tenían una forma redondeada y mostraban disminución de la densidad celular; por otra parte, las células NHFL mostraron un cambio morfológico pequeño y no disminuyó el recuento celular (Fig. 6).

60 En las células SW620 y H1299, se observó casi el 100% de muerte celular el día 3 como resultado de la infección por TRAD a MOI 1. Se reconoció un descenso de más del 80% en el recuento celular incluso a MOI 0,1. Por otra parte, las NHFL casi no mostraron descenso del recuento celular incluso el día 3. Aunque NHFL mostró aproximadamente un 60% de disminución en el recuento celular el día 7 cuando se utilizó TRAD a MOI 1, lo que indicaba que no había influencia vírica a una MOI de 0,01 (Fig. 7).

65

Ejemplo 6

<Examen de la Actividad Antitumoral de TRAD en Modelos Animales>

5 Se trasplantaron células humanas H358 de cáncer de pulmón subcutáneamente en el dorso de ratones desnudos de 5-6 semanas de edad a 5×10^6 células/ratón. Cuando el tumor alcanzó un diámetro aproximado de 5-6 mm, se inyectó intratumoral y localmente un vector adenovirus incapacitado para replicarse (Ad-p53) durante dos días consecutivos a 1×10^8 UFP, 3×10^8 UFP y 1×10^9 UFP por día. Luego, se midieron a intervalos regulares dos ejes que cruzaban en ángulo recto cada tumor. Se calculó el peso estimado del tumor por la siguiente fórmula: (eje mayor) x (eje menor)² / 2. Como control, se utilizó un vector dl312 incapaz de replicarse que no contenía ningún gen insertado.

15 Se trasplantaron células humanas SW620 de cáncer de intestino grueso subcutáneamente en el dorso de ratones desnudos de 5-6 semanas de edad a 5×10^6 células/ratón. Cuando el tumor alcanzó un diámetro aproximado de 5-6 mm, se inyectaron intratumoral y localmente, 2×10^7 UFP de dl312/día y 4×10^3 UFP de TRAD/día durante tres días consecutivos. Se midieron los ejes de cada tumor de la misma manera que se describió anteriormente, y a continuación se calculó el peso estimado del tumor. Los resultados se muestran en las Fig. 8 y 9 (el término "Simulado" que aparece en estas Figuras representa el control al que se administró PBS (solución salina de fosfato tamponada)).

20 La administración de Ad-p53 a 3×10^8 UFP y 1×10^9 UFP inhibió el crecimiento del tumor H358 significativamente ($p < 0,05$). Sin embargo la administración de Ad-p53 a 1×10^8 UFP no reveló una inhibición significativa del crecimiento (Fig. 8). La administración de dl312 (control) indicó que no tenía influencia en el crecimiento tumoral.

25 La administración intratumoral de TRAD a 4×10^3 UFP que es extremadamente más baja que la concentración de Ad-p53 que mostraba efecto antitumoral, inhibió el crecimiento del tumor SW620 significativamente ($p < 0,05$). La administración de dl312 (control) indicó que no tenía influencia sobre el crecimiento tumoral.

30 De todo lo que se ha descrito anteriormente, se comprende que el virus de la presente invención crece eficazmente en las células cancerosas y produce su muerte. Además, como el virus de la invención tiene la capacidad de crecer, es capaz de manifestar un efecto anticáncer potente incluso a bajas concentraciones. Por lo tanto, es posible reducir los efectos secundarios administrando el virus a una concentración baja.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> KANSAI Technology Licensing Organization, Toshiyoshi FUJIWARA, Noriaki TANAKA, Satoru KYO

<120> Oncólisis con virus competente de replicación específica tumoral

40 <130> P03-75

<150> JP2002-198941

<151> 08-07-2002

45 <160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

50 <210> 1

<211> 899

<212> ADN

<213> célula 293

55 <400> 1

acaccgggac tgaaaatgag acataitac tgcacggag gigtattac cgaagaaig 60
 gccgccagtc tttggacca gctgacgaa gaggtacigg ctgataatci tccacctct 120
 agccattitg aaccacctac ccttcacgaa ctgtaigatt tagacgigac ggccccgaa 180
 galeccaacg aggaggcgtt ttgcagatt tticccgact ctgtaatglt ggccggtcag 240
 gaagggattg acttactcac tticccgccc gcgcccggtt ctccggagcc gccicaccti 300
 tcccggcagc ccgagcagcc ggagcagaga gccttgggtc cggtttclat gccaaaccti 360
 gtaccggagg lgategatci iacctgccac gaggciggct ttccaccag tgacgacgag 420
 gatgaagagg glgaggaglt lgtgttagat taigtggagc accccgggca cggttgcagg 480
 tctgtcatt atcaccggag gaatacgggg gaccagata ttatgtgtc gcttigtat 540
 atgaggacct gttgcatglt tctctacagt cctgtgtctg aacctgagcc tgagcccgag 600
 ccagaaccgg agcctgcaag acctaccgc cgtcciaaaa tggccctgc tctcctgaga 660
 cgccccacat cactgtgtc tagagaatgc aatagtagta cggalagctg tgactccgtt 720
 ccttcaaca cactccctga gatacaccg gttgtcccgc tgtgccccat taaaccagtt 780
 gccgtgagag ttggtgggccc tgcaccagct gttgaaatgta tgcaggactt gcttaacgag 840
 cctgggcaac ctttggactt gagcgtaaa cgccccagcc cataagggtt aaaccigtg 899

<210> 2
 <211> 1823
 <212> ADN
 <213> célula 293
 <400> 2

5

ES 2 455 127 T3

ctgacctcat ggaggcttgg gagtgittgg aagatttttc tgcctgctgt aacttgctgg	60
aacagagctc taacagtacc tcttggtttt ggaggtttct gggggctca tccaggcaa	120
agttagctcg cagaattaag gaggattaca agtgggaatt tgaagagctt ttgaaatcct	180
gtggtagctt gtttgattct ttgaatctgg gtcaccaggc gcttttcaa gagaaggta	240
tcaagacttt ggatttttcc acaccggggc gcctgctggc tgcctgttct tttttgagtt	300
ttataaagga taaatggagc gaagaaacct atctgagcgg ggggtacctg ctggattttc	360
tggccatgca tctgtggaga gcggttctga gacacaagaa tgccttctca ctgttctctt	420
ccgtccgcc ggcgataata ccgaccggag agcagcagca gcagcaggag gaagccaggc	480
ggcggcggca ggagcagagc ccatggaacc cgagagccgg cctggacctt cgggaatgaa	540
tgtttgtacag gtggctgaac tgtatccaga actgagacgc attttgaaa ttacagagga	600
tgggcagggg cttaaagggg taaagagga gcgggggctt tglaggctca cagaggaggc	660
taggaatctc gcttttagct taatgaccag acaccgtctt gagtgtatta cttttcaaca	720
gatcaaggat aattgcctca atgagcttga tctgctggcg cagaagtatt ccatagagca	780
gctgaccact tactggctgc agccagggga tgattttgag gaggctatta gggttatgct	840
aaaggiggca cttaggccag attgcaagta caagatcagc aaacttgtaa atatcaggaa	900
ttgttgcctc atttctggga acggggccga ggiggagata galaccggag ataggggtgc	960
ctttagatgt agcatgataa atatgtggcc ggggttctt ggcatggagc gggttgttat	1020
tatgaatgta aggtttactg gcccgaattt tagcgttacc gttttcttgg ccaataccaa	1080

ccttatcccta cacgggigiaa gcttictaigg gttlaacaat accigtigtgg aagcctggac 1140
 cgalgiaagg gttcggggct gtagccttta ctgctcctgg aagggggggg tgtgtcggcc 1200
 caaaagcagg gcttcaatta agaaatgctt ctttgaagg lgtacctgg gtaaccgtc 1260
 tgaggglac tccagggtgc gccacaatgt ggctccgac lgtgggtgt tcatgctagt 1320
 gaaaagcgig gctgtgatta agcataacat ggtatgtggc aacigcgagg acagggcctc 1380
 tcagatgctg acctgtcgg acggcaactg tcaccigtg aagaccattc acgtagccag 1440
 ccactctgc aaggcctggc cagigtitga gcataacata ctgacctgt gttccttga 1500
 ttggglaac aggagggggg ttttctacc ttaccaatgc aattgagtc acactaagat 1560
 attgcttgag cccgagagca tctcaaggt gaaccigaac ggggigtgt acatgacct 1620
 gaagatcgg aagggtctga ggtacgatga gaccgcacc aggtgcagac cctgcgagtg 1680
 tggcggtaaa catattagga accagcctgt gatgctggat gtgaccgagg agctgaggcc 1740
 cgalcactig gtgctggcct gcacctggc ttagttggc tctagcagtg aagalacaga 1800
 ttgaggtact gaaatgtgtg ggc 1823

<210> 3
 <211> 605
 <212> ADN
 <213> célula 293
 <
 400> 3

5

tgcactiagg gggccaatt cgccectct ccccccccc cccctaact tactggccga 60
 agccgttgg aataaggccg gtgtgcgttt gctataatgt gatttccac catattgccg 120
 tctttggca atgtgaggc cggaaacct ggccctgtct tctgacgag cttctciagg 180
 ggtcttccc ctctgcca aaggaatgcaa ggtcigtiga atgtcgtgaa ggaagcagtt 240
 cctciggaag ctcttgaag acaaacacg tctgtagcga cctttgcag gcagcggaac 300
 cccccactg gcgacaggig cctctgccc caaaagccac ggtataaga tacaccigca 360
 aaggcggcac aacccagig ccactgtgt agttggatag ttgtggaaag agtcaaatgg 420
 ctctctcaa ggtattcaa caagggctg aaggatgccc agaaggtacc ccattgtatg 480
 ggalctgatc tggggcctcg gtcacatgc ttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaa 540
 cgtclaggcc cccgaacca cggggactg gtttcttt gaaaaacac atgataagct 600
 tgcca 605

10

ES 2 455 127 T3

<210> 4
 <211> 455
 <212> ADN
 <213> célula 293
 5
 <400> 4

 iggccccicc ctggggttac cccacagcct aggcggatc gaccctcctc cgtcggggcc 60
 ctctgtggcg tccctgcacc ctgggagcgc gagcggcgcg cgggcgggga agcgcggccc 120
 agacccccgg gtccgcccgg agcagctcgc ctgtcggggc caggccgggc tcccagtgga 180
 ttccggggca cagacgcccga ggaccgcgtc ccccacgtgg cggagggact ggggaccggg 240
 gcaccgctc tgccttca ccttccagct cgcctcctc cgcgcggacc ccgcccgtc 300
 ccgacccctc ccgggtccc ggcccagccc cctcggggc ctcccagccc ctcccctcc 360
 ttccggggc ccgcccctc cctcggggc cgagttcag gcagcgtc gtctcgtc 420
 gcactggga agccctggc ccggccacc ccgc 455

 10
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> célula 293

 15
 <400> 5
 acaccgggac tgaatgag 20

 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> célula 293
 20

 <400> 6
 cacagttta cacctatg c 21
 25

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> célula 293
 30

 <400> 7
 ctgacctcat ggagcttg 20

 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> célula 293
 35

 <400> 8
 gccacacat ttcagtacct c 21
 40

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende el promotor hTERT, un gen de adenovirus E1A, una secuencia IRES y un gen de adenovirus E1B en este orden, donde el promotor hTERT consiste en la secuencia SEC ID N° 4, el gen de adenovirus E1A consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 1, la secuencia IRES consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 3, y el gen de adenovirus E1B consiste en la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 2.
5
2. Un adenovirus que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende el adenovirus de acuerdo con la reivindicación 2 como principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
4. Un adenovirus como se definió en la reivindicación 2 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal como terapia.
15
5. Un adenovirus como se definió en la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa hTERT.
- 20 6. Un adenovirus para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el cáncer que expresa hTERT es al menos un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de estómago, intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de vesícula/ conductos biliares, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de tiroides y cáncer ovárico.
- 25 7. El adenovirus para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el cáncer que expresa hTERT es al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en osteosarcoma y tumor cerebral.
8. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 3 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal como terapia.
- 30 9. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa hTERT.
- 35 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer que expresa hTERT es al menos un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de estómago, intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de vejiga, cáncer de vesícula/ conductos biliares, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de tiroides y cáncer ovárico.
- 40 11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, donde el cáncer que expresa hTERT es al menos uno que se selecciona de entre el grupo que consiste en osteosarcoma y tumor cerebral.

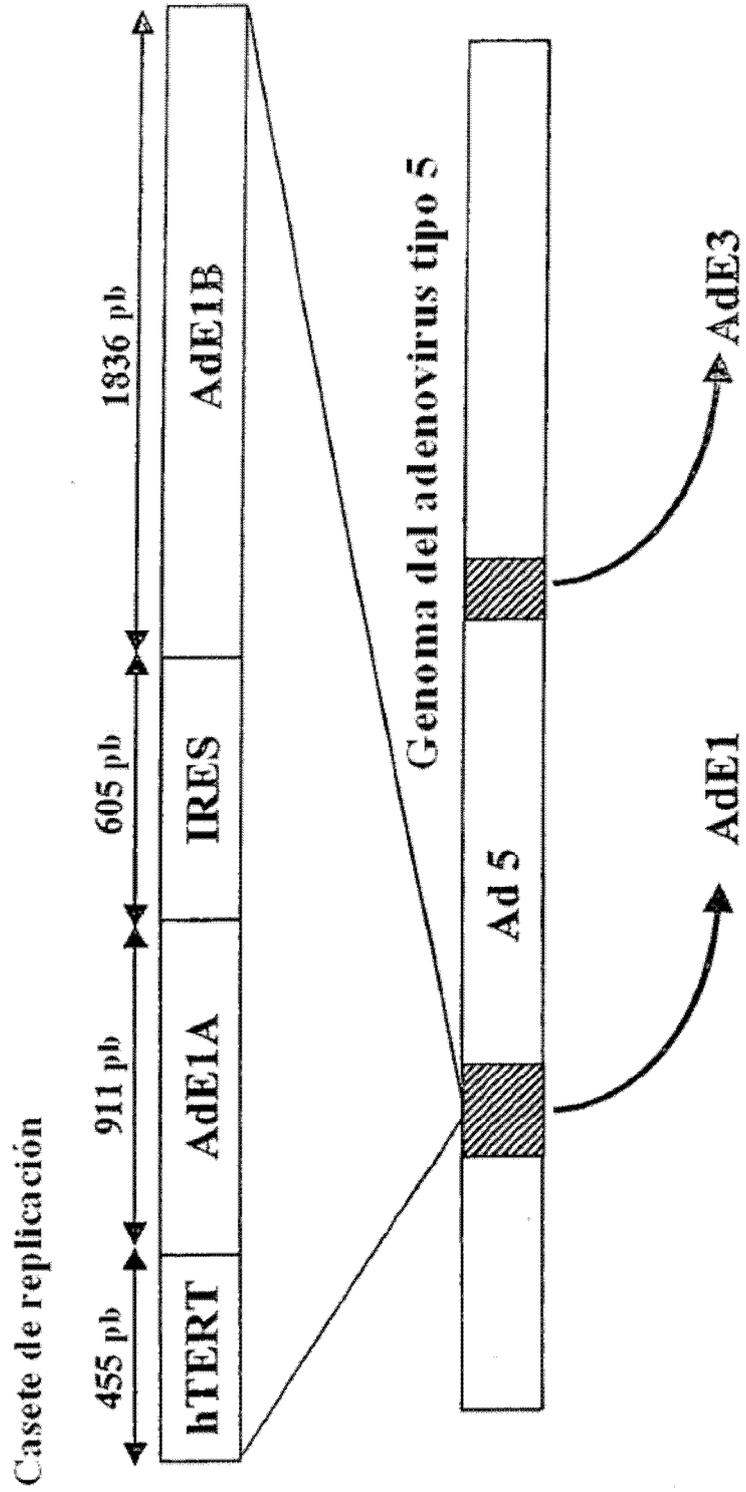
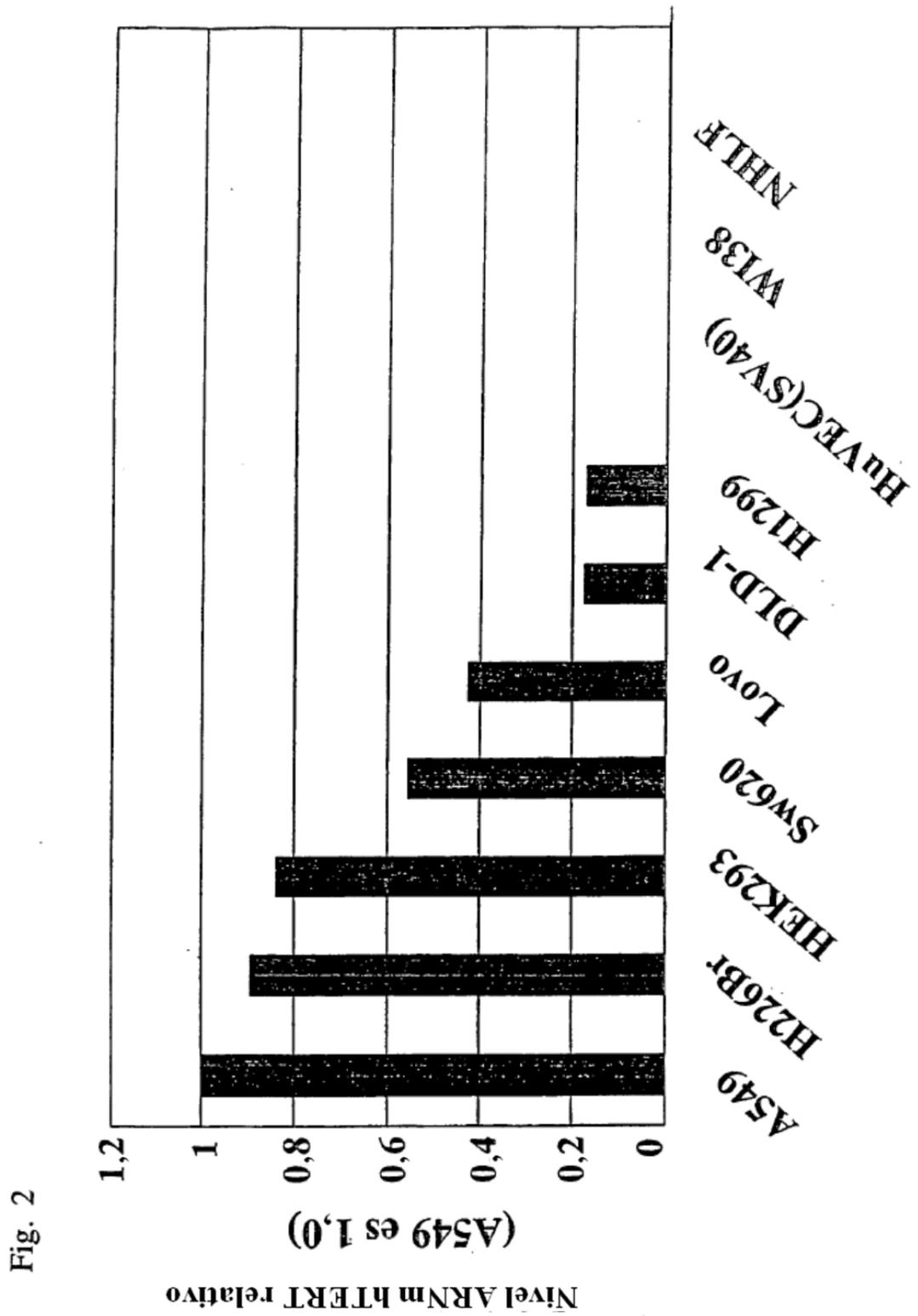
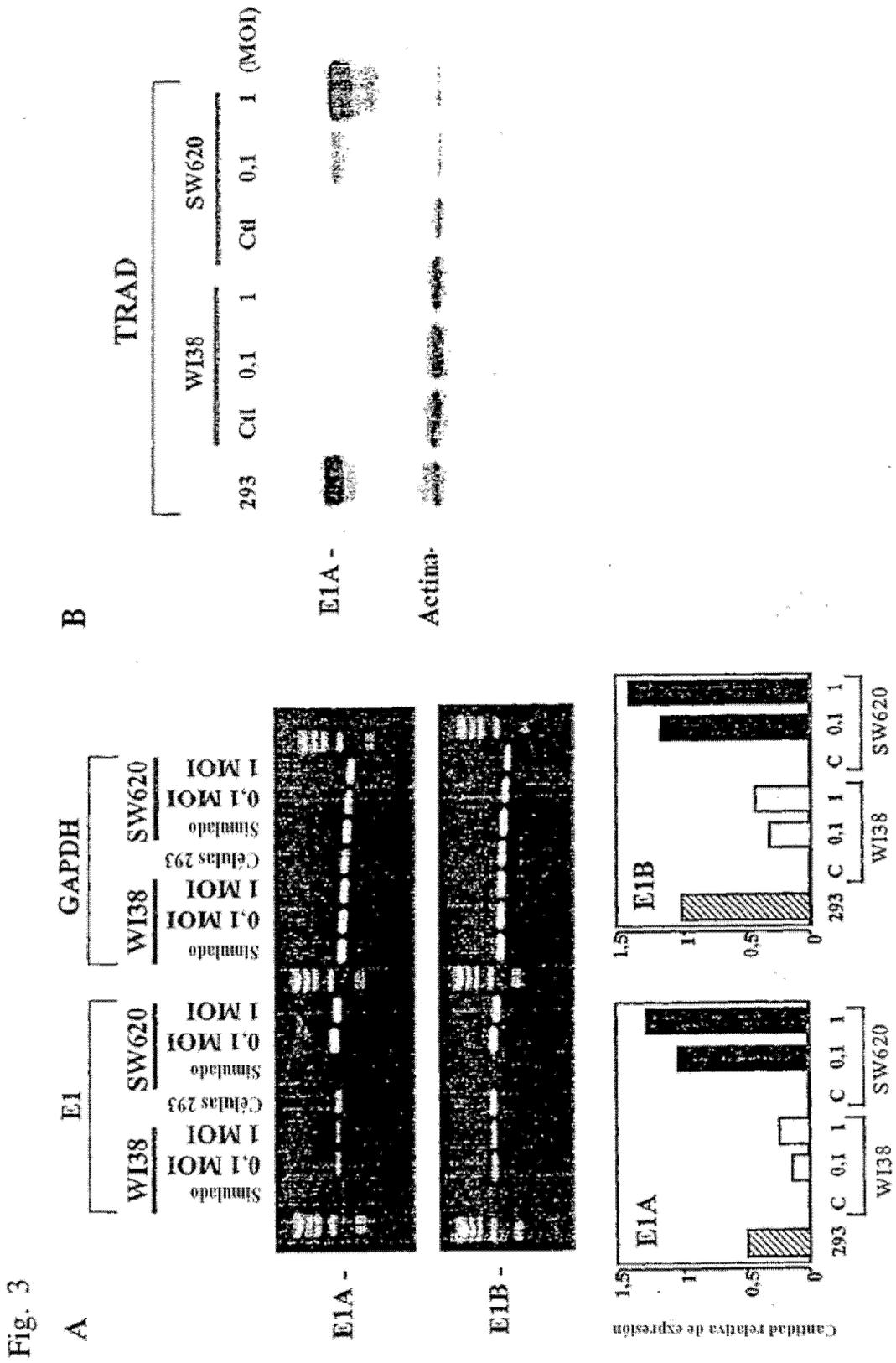


Fig. 1





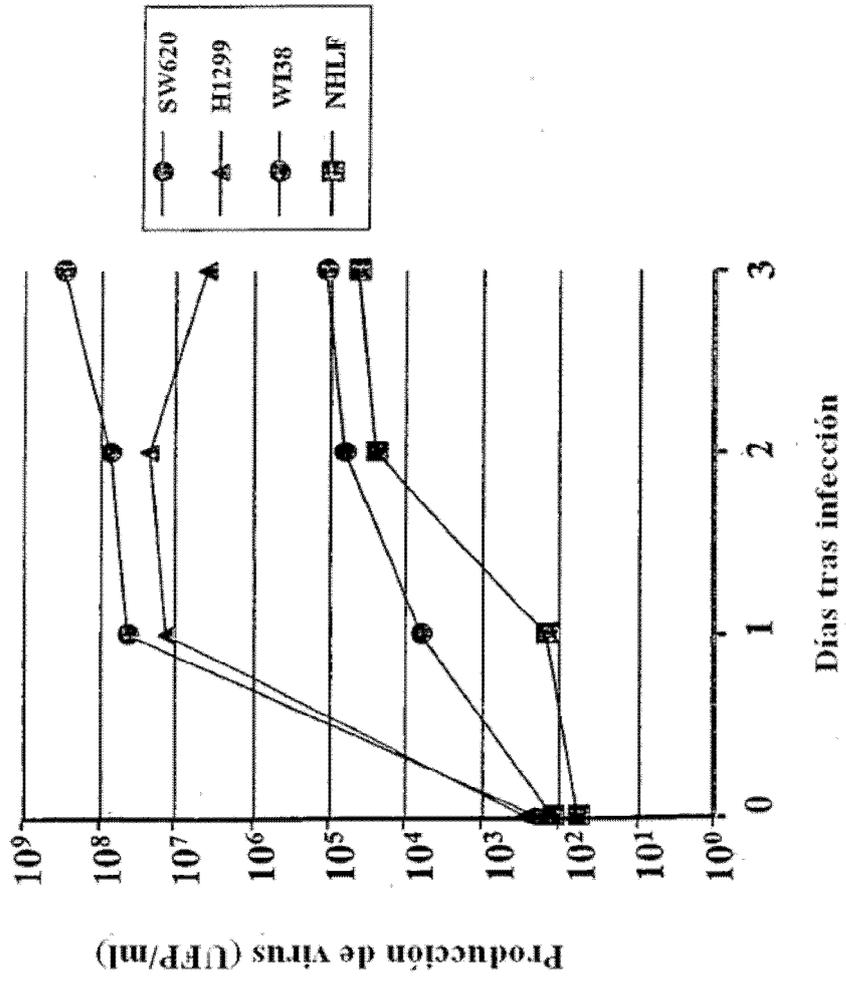
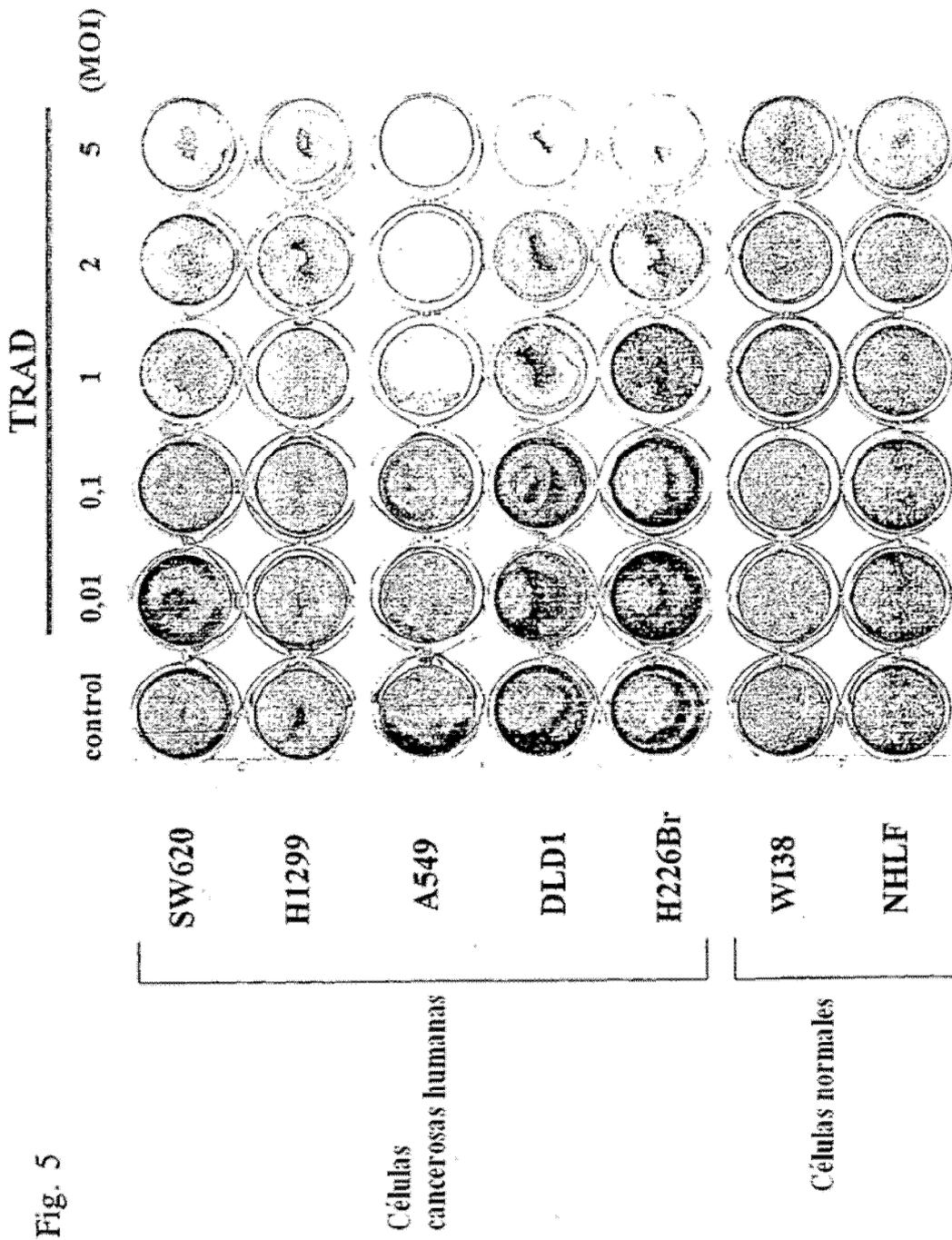


Fig. 4



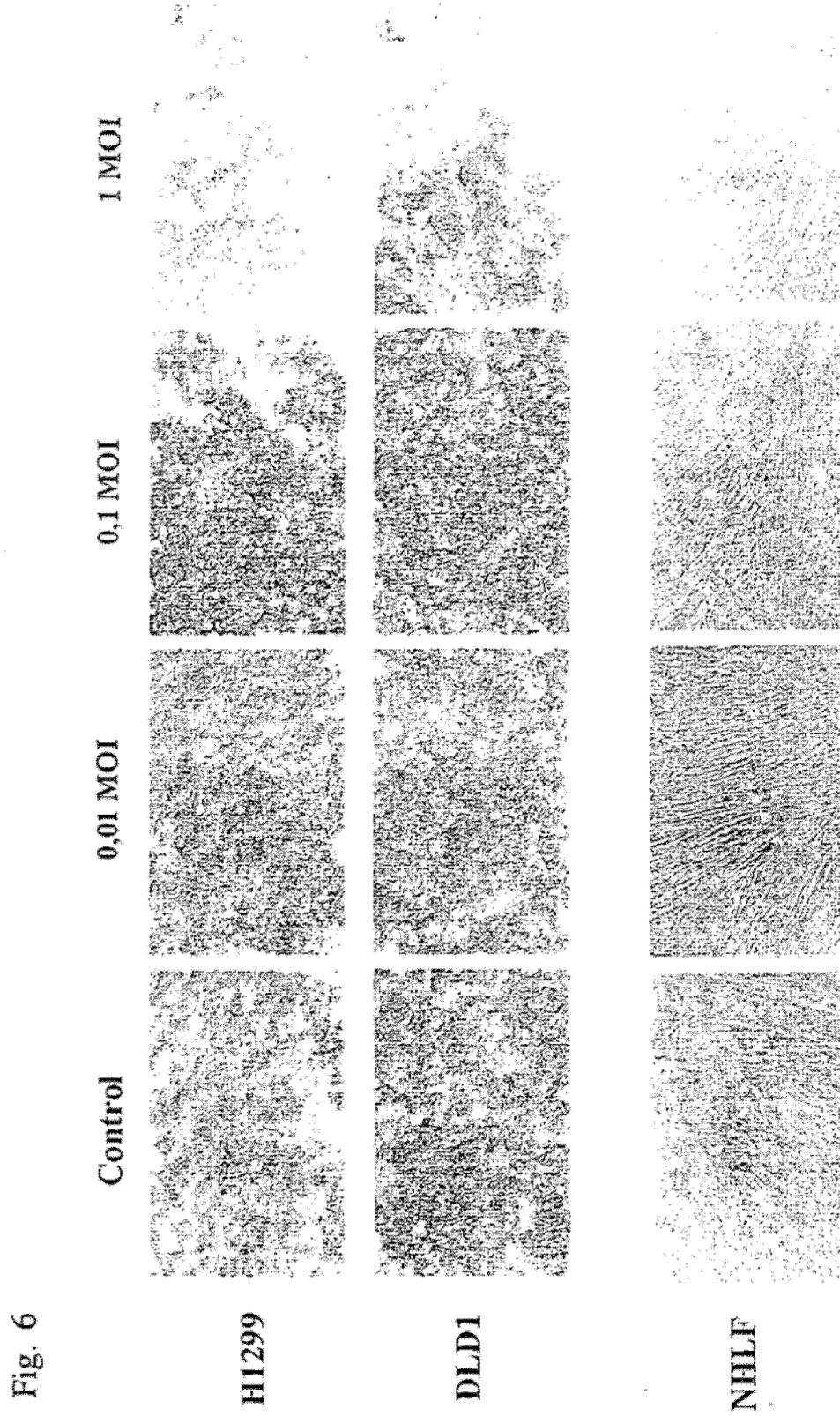
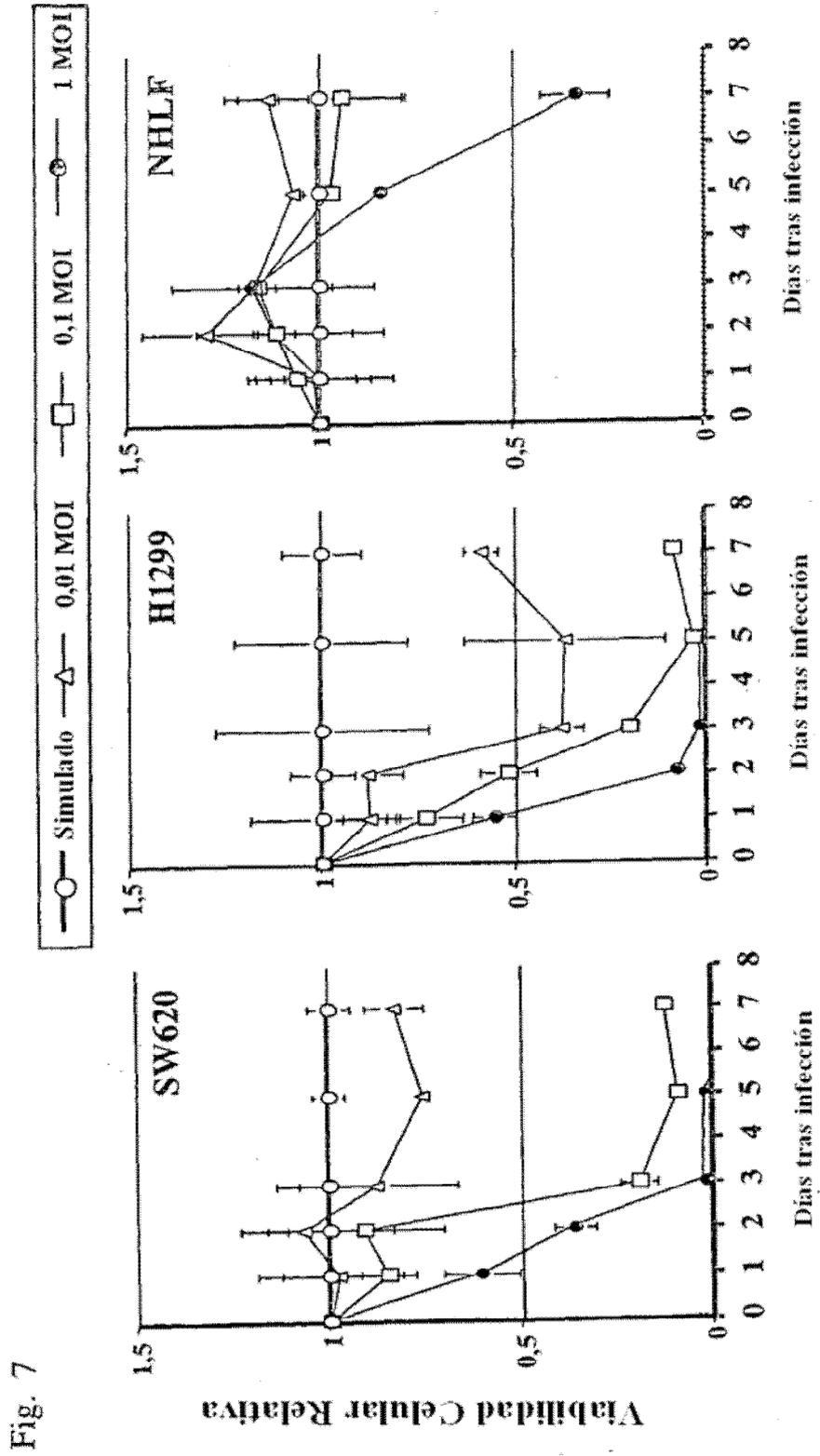
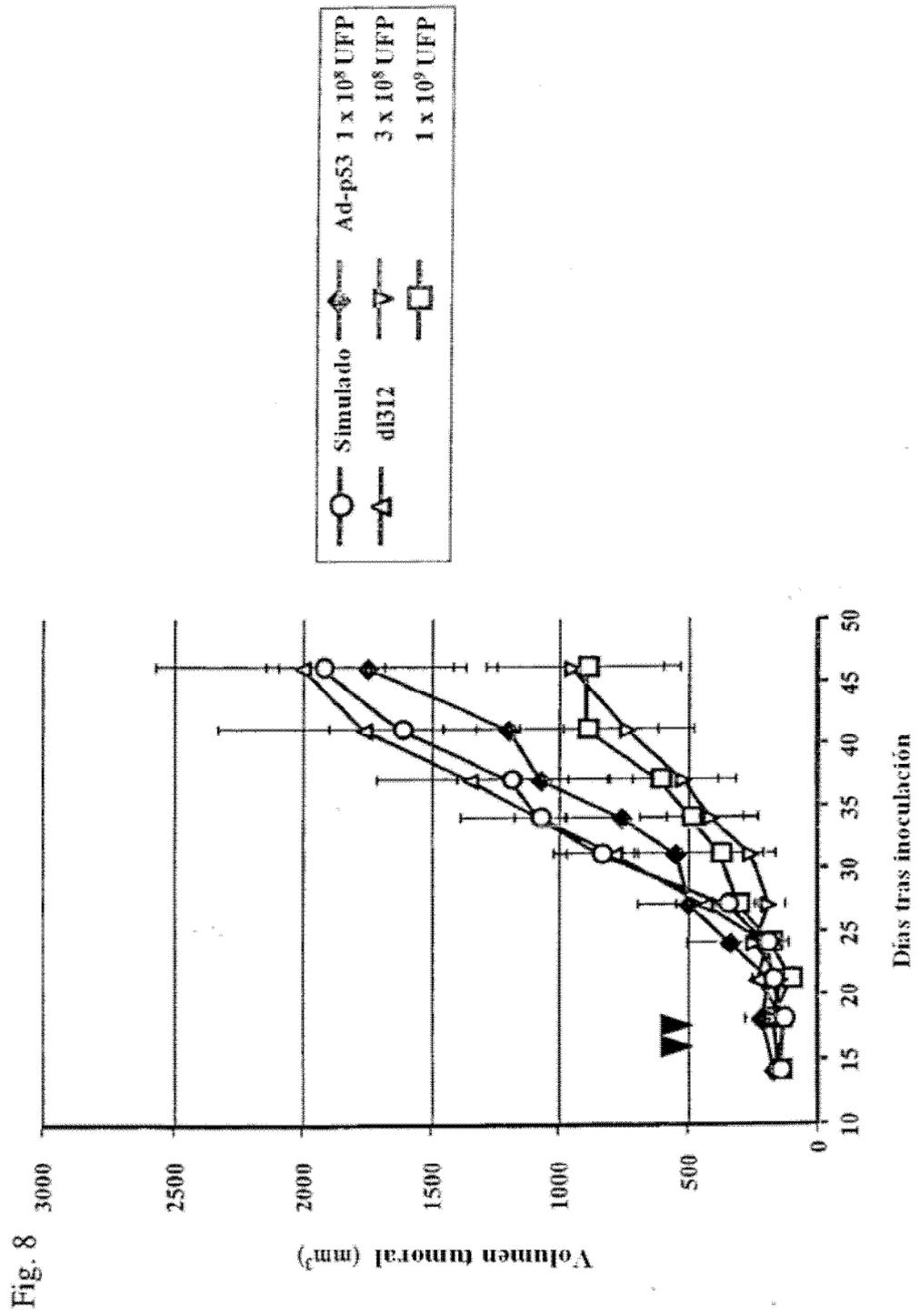


Fig. 6





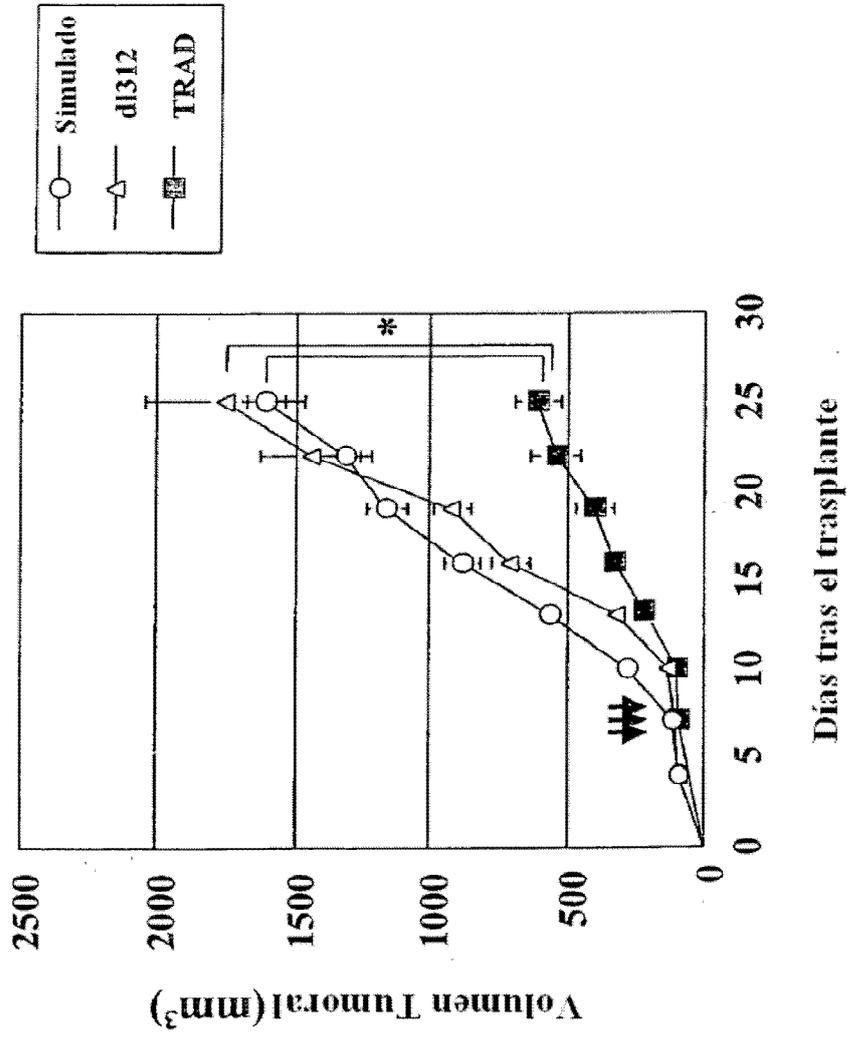


Fig. 9