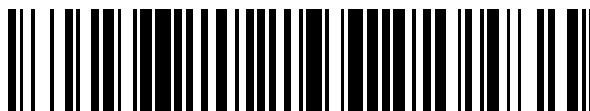


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 955**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2010 PCT/ES2010/000196**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2010 E 10772050 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2428229**

54 Título: **Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

06.05.2009 ES 200901201

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.02.2017

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ
BIOMÈDICA (50.0%)**

**Hospital Duran i Reynals, 3ª planta, Gran Via de
l'Hospitalet, 199**

**08908 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES y
INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUEDAN CARRIÓ, SÒNIA;
CASCALLO PIQUERAS, MANEL MARIA y
ALEMANY BONASTRE, RAMÓN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 600 955 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

Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer

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

Técnica antecedente

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

- 25 La viroterapia del cáncer es anterior a la terapia génica. Las primeras observaciones de curaciones de tumores con virus datan de principios del siglo pasado. Ya en 1912 De Pace obtuvo regresiones tumorales tras inocular el virus de la rabia en carcinomas del cuello uterino. Desde entonces se han inyectado en tumores muchos tipos de virus para su tratamiento. Hay virus que presentan un oncotropismo natural tal el parvovirus autónomo, el virus de la estomatitis vesicular y el reovirus. Otros virus se pueden manipular genéticamente para que repliquen selectivamente en tumores. Por ejemplo el virus del Herpes Simple (HSV) se ha hecho oncotrópico al eliminar el gen de la ribonucleótido reductasa, una actividad enzimática innecesaria en células en proliferación activa tales como las células tumorales. Sin embargo, el adenovirus, debido a su baja patogenicidad y elevada capacidad de infectar células tumorales, ha sido el virus más frecuentemente utilizado en viroterapia y en terapia génica del cáncer.

- 35 Se han identificado cincuenta y un serotipos de adenovirus humanos y clasificado en 6 grupos distintos del A al F.

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

- Hay dos aspectos importantes a considerar en relación al diseño de adenovirus oncolíticos: la selectividad y la potencia. Para obtener selectividad hacia la célula tumoral se han usado tres estrategias: la eliminación de funciones víricas que son necesarias para la replicación en células normales, pero que no son necesarias en células tumorales; el control de los genes víricos que inician la replicación utilizando promotores selectivos de tumor y la modificación de las proteínas de la cápside del virus implicadas en la infección de la célula hospedadora. Con estas modificaciones genéticas se ha obtenido un nivel de selectividad considerable, con una eficacia de replicación en células tumorales del orden de 10000 veces superior a la eficacia de replicación en células normales. Con respecto a la potencia oncolítica, también se han descrito diversas modificaciones genéticas para aumentarla. Estas modificaciones incluyen: a) el aumento de la liberación de virus, por ejemplo mediante la eliminación de E1B19K, la sobreexpresión de E3-11.6K (ADP) o la localización de la proteína E3/19K en la membrana plasmática; y b) la inserción de un gen terapéutico en el genoma del adenovirus oncolítico para generar

un "adenovirus oncolítico armado". En este caso, el gen terapéutico debería mediar la muerte de las células tumorales no infectadas mediante la activación de un profármaco con efecto colateral (es decir, que destruye a las células vecinas no infectadas), la activación del sistema inmunitario contra el tumor, la inducción de la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis o la eliminación de la matriz extracelular, entre otros. En estos casos, la forma y el tiempo de expresión del gen terapéutico serán críticos en el resultado final de la estrategia terapéutica.

En la última década, se han administrado distintos adenovirus oncolíticos a pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, de ovario, colorrectal, pancreático y hepatocelular, entre otros. El perfil de seguridad de estos adenovirus en los ensayos clínicos ha sido muy prometedor. Los efectos secundarios detectados, tales como algunos síntomas similares a la gripe y los niveles crecientes de las transaminasas, fueron bien tolerados, incluso después de la administración sistémica de altas dosis de virus (*cf.* D. Ko *et al.*, "Development of transcriptionally regulated oncolytic adenoviruses", *Oncogene* 2005, vol. 24, pág. 7763-74; y T. Reid *et al.*, "Adenoviral intravascular agents in cancer patients: lessons from clinical trials", *Cancer gene therapy* 2002, vol. 9, pág. 979-86). Aunque la administración de los adenovirus recombinantes indujo una supresión parcial del crecimiento tumoral, no se consiguió la erradicación completa de los tumores y, después de un corto periodo de tiempo, los tumores volvieron a crecer rápidamente. Estos resultados se produjeron probablemente debido a que el adenovirus inyectado solo se distribuyó en una pequeña parte del tumor para producir una respuesta antitumoral limitada, mientras las células no infectadas siguieron creciendo rápidamente. En un trabajo reciente, se observó que la replicación de adenovirus oncolíticos en tumores de xenoinjerto humanos persistía hasta 100 días después de la administración sistémica, aunque esta replicación no se traducía en una erradicación completa del tumor (*cf.* H. Sauthoff *et al.*, "Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points", *Human gene therapy* 2003, vol. 14, pág. 425-33). Esta baja eficacia antitumoral se debe en parte a que el tejido conectivo y la matriz extracelular (MEC) en el tumor impiden la propagación del adenovirus en el tumor.

Esta dificultad de los adenovirus oncolíticos de propagarse de forma eficaz por la masa tumoral se ha descrito también para otros fármacos antitumorales como la doxorrubicina, el taxol, la vincristina o el metotrexato. Son muchos los estudios que demuestran el papel de la MEC en la resistencia de las células tumorales a los fármacos quimioterapéuticos (*cf.* BP Toole *et al.*, "Hyaluronan: a constitutive regulator of chemoresistance and malignancy in cancer cells", *Seminars in cancer biology* 2008, vol. 18, pág. 244-50). Las células tumorales y las células del estroma producen y ensamblan una matriz de colágeno, proteoglucanos y otras moléculas que dificultan el transporte de macromoléculas dentro del tumor. GANESH S. *et al.*: "Relaxin-expressing fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice", *CANCER RES*, vol. 67, n.º. 9, 2007, páginas 4399-4407, y KIM JOO-HANG *et al.*: "Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy", *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, OXFORD UNIVERSITY PRESS*, vol. 98, n.º. 20, 1 de octubre de 2006 (01-10-2006), páginas 1482-1493, divulgan ambos adenovirus recombinantes que expresan relaxina, una enzima que degrada la matriz extracelular. Estos virus recombinantes se propagan mejor y tiene una eficacia antitumoral aumentada.

El ácido hialurónico (AH) es uno de los principales componentes de la MEC implicado en la resistencia de las células tumorales a los fármacos terapéuticos. El AH se encuentra sobreexpresado en una gran variedad de tejidos malignos, y en muchos casos el nivel de AH es un factor pronóstico de progresión tumoral. La interacción del AH con los receptores CD44 y RHAMM aumenta la supervivencia y la invasión tumoral. Además, el AH puede promover las metástasis tumorales mediante la inducción de la adhesión y la migración celular, y la protección frente al sistema inmunitario.

Por otra parte, la inhibición de las interacciones entre el ácido hialurónico y las células tumorales revierte la resistencia a muchos fármacos. Distintos estudios han indicado que las hialuronidasas (enzimas que degradan AH) aumentan la actividad de distintas quimioterapias en pacientes con melanoma, sarcoma de Kaposi, tumores de cabeza y cuello, y metástasis hepáticas de carcinoma de colon. El mecanismo de acción de las hialuronidasas es aún desconocido, pero por lo general se atribuye a la disminución de las barreras de adhesión celular, la disminución de la presión intersticial y a la mejora de la penetración del fármaco antitumoral en el tumor, más que a sus efectos inhibidores de las rutas de señalización relacionadas con la supervivencia celular.

Recientemente se ha descrito que la coadministración de hialuronidasa modelos de tumores metastásicos", *Clin Cancer Res* 2008, vol. 14, pág. 3933-41). En estos estudios los adenovirus oncolíticos se administran en cuatro inyecciones intratumorales y la hialuronidasa se administra por vía intratumoral en días alternos durante todo el tratamiento. Esta pauta de administración es poco aplicable en pacientes debido a que la mayoría de los tumores son inaccesibles para inyectarlos por vía intratumoral. Los pacientes con enfermedad diseminada (metástasis) no se podrían beneficiar del tratamiento propuesto por Ganesh y colaboradores.

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

Sumario de la invención

Los inventores han encontrado que un adenovirus que se replica y que contiene en su genoma el gen de la hialuronidasa, se distribuye de forma más eficaz en la masa tumoral. La expresión de la hialuronidasa por parte del adenovirus oncolítico da como resultado la degradación del ácido hialurónico que es parte de la matriz extracelular del tumor. La degradación del ácido hialurónico da como resultado una presión intersticial en el tumor más baja y una menor resistencia del tumor a la propagación del adenovirus y, por lo tanto, mejora la propagación célula a célula del virus dentro de la masa tumoral. Esta mejor propagación se traduce en un aumento del efecto oncolítico. Los inventores han encontrado que inyectando el adenovirus oncolítico de la invención por vía endovenosa se obtienen regresiones del volumen tumoral. Por lo tanto, el adenovirus oncolítico de la presente invención es útil para el tratamiento del cáncer. Además, la expresión del gen de la hialuronidasa no afecta a la replicación vírica ni a la citotoxicidad del adenovirus oncolítico.

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

Como se describe en los ejemplos, la administración intratumoral *in vivo* del adenovirus oncolítico de la invención mejora el efecto antitumoral respecto a un adenovirus control sin hialuronidasa insertada (véase la FIG. 7). Notablemente, cuando se inyecta el adenovirus oncolítico de la invención por vía endovenosa (véanse las FIG. 8 y FIG 9) y comparándolo con los resultados presentados en la figura 2 del manuscrito de Ganesh *et al.*, se observa una inhibición del crecimiento tumoral mucho mayor con el adenovirus de la presente invención. Esto indica que el tratamiento de la invención es más eficaz. Los tumores de los ratones inyectados con el adenovirus oncolítico de la invención (ICOVIR17) muestran zonas necróticas muy extensas, zonas con menos células viables, y grandes y numerosos focos de replicación vírica, en comparación con los tumores inyectados con el adenovirus control, ICOVIR15.

Además, con el adenovirus de la invención las dosis administradas son menores: en Ganesh *et al.* (citado anteriormente) se administran cuatro inyecciones intratumorales de 1×10^{10} partículas víricas, mientras que en la presente invención se administra una única dosis endovenosa de 2×10^9 partículas víricas. Esto significa una reducción en la dosis de 20 veces y la ventaja de que se trata de una única dosis. En su estrategia, Ganesh *et al.* administran la hialuronidasa por vía intratumoral en días alternos durante todo el experimento. Además el adenovirus también se administra por vía intratumoral al inicio del tratamiento. Esta administración intratumoral de virus y hialuronidasa es difícilmente aplicable a la clínica debido a que la mayoría de tumores no son accesibles para una administración intratumoral. Presumiblemente, la coadministración de hialuronidasa soluble y adenovirus no se realizó por vía sistémica debido a que la probabilidad de que ambos componentes alcancen de forma conjunta las células tumorales dispersas en el organismo es baja.

La presente invención permite la expresión de la hialuronidasa en el sitio y en el momento que tiene lugar la replicación vírica. Esta expresión de hialuronidasa mejora la distribución del virus a través de la masa tumoral y aumenta su potencia antitumoral. Es factible administrar dosis ajustadas, no tóxicas para el animal y con una gran eficacia en el tratamiento.

En la presente invención los adenovirus oncolíticos llegan a las células tumorales diana. Una vez dentro, el virus se replica, se expresan sus proteínas de la cápside y, al mismo tiempo, se expresa la hialuronidasa codificada en el genoma adenovírico. Esta hialuronidasa se ha modificado para que se libere al medio extracelular que rodea a la célula. En el medio extracelular, la hialuronidasa destruye la matriz y ayuda a que los adenovirus que se han replicado infecten las células tumorales vecinas.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "adenovirus oncolítico" significa un adenovirus que es capaz de replicar o que es competente para la replicación en la célula tumoral. En esta descripción adenovirus oncolítico y adenovirus replicativo son sinónimos. Son distintos de un adenovirus no replicativo porque este último no tiene la capacidad de replicar en la célula diana. Los adenovirus no replicativos son los utilizados en terapia génica como transportadores de genes a las células diana dado que el objetivo es expresar el gen terapéutico dentro de la célula intacta y no la lisis de la célula. En cambio, la acción terapéutica de los adenovirus oncolíticos se basa en la capacidad de replicarse y lisar la célula diana, y en particular la célula tumoral que se quiere eliminar.

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

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

5 Otro aspecto de la invención se refiere al adenovirus oncolítico de la invención para el tratamiento de un cáncer o de una forma pre-maligna de cáncer, en un mamífero incluyendo un humano.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del adenovirus oncolítico para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o de una forma pre-maligna del cáncer, en un mamífero incluyendo un humano. El tratamiento se basa en la replicación de estos adenovirus oncolíticos en tumores. Como alternativa, este aspecto de la invención se puede formular como un método para el tratamiento en un mamífero, incluyendo el hombre, de un cáncer o de una forma pre-maligna de cáncer, que comprende la administración a dicho mamífero, de una cantidad eficaz del adenovirus oncolítico.

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

20 En una realización particular, el adenovirus oncolítico de la invención es un adenovirus humano, es decir que infecta humanos.

25 Se entiende como "derivado" un adenovirus recombinante híbrido de dos o más serotipos distintos de adenovirus, por ejemplo adenovirus serotipo 5 con la fibra del adenovirus serotipo 3. En una realización particular de la invención, el adenovirus oncolítico humano es del serotipo 5.

30 Las hialuronidasas son una familia de enzimas que degradan ácido hialurónico. En los seres humanos existen 6 genes que codifican hialuronidasas con propiedades y emplazamientos distintos. Las isoformas Hyal1 y Hyal2 están presentes en la mayoría de los tejidos. Hyal1 la forma predominante en el plasma humano. Hyal3 está presente en medula ósea y en los testículos, pero su función no está bien caracterizada. La hialuronidasa PH20 se expresa de forma elevada en los testículos y está implicada en el proceso de fertilización del ovocito por el espermatozoide. La hialuronidasa PH20 está anclada en la membrana plasmática y en la membrana acrosomal interna de los espermatozoides y confiere al espermatozoide la capacidad de penetrar a través de la matriz extracelular del cúmulus (rica en ácido hialurónico) para alcanzar la zona pelúcida del ovocito. Durante la reacción acrosomal, parte de las hialuronidasas ancladas en la membrana del espermatozoide se procesan enzimáticamente para producir una forma soluble de la proteína que se libera de la membrana acrosomal. Además, la hialuronidasa se ha identificado como el factor de diseminación del veneno de serpientes, arañas, escorpiones y avispas.

40 En una realización particular, la enzima hialuronidasa es una hialuronidasa testicular de mamífero, y de forma más particular, la hialuronidasa testicular humana. La hialuronidasa testicular humana (ID de GenBank Gene: 6677) también se conoce como SPAM1 o molécula de adhesión del espermatozoide 1, y como PH-20. La proteína de membrana PH20, es la única enzima de la familia de las hialuronidasas de mamífero con actividad a pH neutro. El gen que la codifica produce dos variantes transcripcionales: la variante 1, más larga, que codifica la isoforma 1 de la proteína (número de acceso de GenBank NP_003108.2) y la variante 2, que utiliza una señal de corte y empalme alternativa en la región codificante 3' en comparación con la variante 1, que da como resultado la isoforma 2 con un extremo C más corto (número de acceso de GenBank NP_694859.1).

50 En una realización particular de la invención, la secuencia de la enzima tiene deletionada la secuencia que corresponde al dominio carboxilo terminal de unión a membrana para producir una enzima soluble (véase la FIG. 2). La deletión de este dominio carboxilo terminal da como resultado la secreción de la hialuronidasa al medio extracelular. Por lo tanto, se ha obtenido un adenovirus oncolítico que expresa una hialuronidasa secretada con actividad enzimática a pH neutro. En una realización particular, la secuencia que se inserta en el genoma adenovirico es una que codifica la SEQ ID NO: 1. En una realización más particular, la secuencia que se inserta es la SEQ ID NO: 2.

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

60 En otra realización particular, la expresión de la enzima está controlada por un promotor activo en células animales. En particular, el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor del citomegalovirus, el promotor principal tardío del adenovirus, el promotor de SV40, el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple, el promotor de RSV, el promotor EF1 alfa, el promotor de la beta-actina, el promotor de la IL-2 humana, el promotor de la IL-4 humana, el promotor de IFN, el promotor de E2F y el promotor del GM-CSF

humano. El promotor que controla la expresión de la enzima puede estar en el adenovirus de manera natural como es el caso del promotor principal tardío del adenovirus (véase la FIG. 1 (a), MLP, *major late promotor*). El promotor también puede insertarse junto a la secuencia que codifica la enzima. En una realización preferente, el promotor es el promotor principal tardío del adenovirus.

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

15 Otra modificación para obtener replicación selectiva en tumores es la eliminación de funciones de E1A que bloquean la ruta de retinoblastoma (RB). Otros genes víricos que interactúan de forma directa con pRB, tales como E4 y E4orf6/7, son candidatos a eliminarse para obtener la replicación selectiva en células tumorales. Como se muestra en los ejemplos, el adenovirus oncolítico ICOVIR17 se caracteriza por contener de forma simultánea el gen de la hialuronidasa, la delección $\Delta 24$ que afecta a la interacción de E1a con pRB, la inserción de cuatro sitios de
20 unión a E2F-1 y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1a para controlar la expresión de E1a y, finalmente, la inserción del péptido RGD en la fibra adenovírica para aumentar la infectividad del virus. ICOVIR17 es una realización preferente de la invención.

25 Otra modificación descrita para obtener replicación selectiva en tumores es la eliminación de los genes adenovíricos que codifican los ARN asociados a virus (ARN-AV). Estos ARN bloquean la actividad antivírica del interferón y, cuando se delecionan, los adenovirus se vuelven sensibles a ser inhibidos mediante interferón. Puesto que las células tumorales se caracterizan por el truncamiento de la ruta del interferón, tales adenovirus replican en niveles normales en tumores. Por lo tanto, en otra realización particular, la replicación selectiva en tumores se
30 obtiene con mutaciones en uno o más genes del grupo E1a, E1b, E4 y los ARN-AV del adenovirus. Preferentemente las mutaciones están en E1a.

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

35 En otra realización de la invención, el adenovirus tiene modificaciones en su cápside para aumentar su infectividad o para dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral. En una realización preferente las proteínas de la cápside adenovírica se han modificado genéticamente para incluir ligandos que aumentan la infectividad o que dirigen el virus a un receptor en la célula tumoral. Dirigir el adenovirus al tumor también se puede conseguir con ligandos bifuncionales que se unen al virus por un lado y al receptor tumoral por otro. Por otro lado, para aumentar
40 la persistencia del adenovirus en sangre y, por lo tanto, aumentar las posibilidades de alcanzar nódulos tumorales dispersos, la cápside puede recubrirse con polímeros como el polietilenglicol. En una realización preferente, el adenovirus oncolítico tiene la cápside modificada para aumentar su infectividad o para dirigirlo mejor a la célula diana por medio de un reemplazo del dominio de unión a heparán sulfato KKTK en la fibra del adenovirus por el dominio RGDK. En los ejemplos se explica la construcción de un adenovirus con estas características, el
45 ICOVIR17RGDK.

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

50 En otra realización particular, el adenovirus comprende una secuencia que promueve la expresión de la secuencia que codifica la hialuronidasa. De forma más particular, esta secuencia se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de corte y empalme que permite el procesamiento del ARN, una secuencia IRES (*internal ribosome entry site*), y la secuencia 2A de picornavirus.

55 En otra realización particular, el adenovirus oncolítico comprende otros genes insertados en su genoma que se utilizan comúnmente en el campo de la terapia génica del cáncer, para aumentar la citotoxicidad de los adenovirus oncolíticos sobre células tumorales. Algunos de ellos son el gen de la timidina quinasa, el gen de la citosina desaminasa, genes proapoptóticos, genes inmunoestimuladores, genes supresores tumorales o activadores de
60 profármacos.

Estas modificaciones en el genoma del adenovirus no son excluyentes entre ellas. Existen varios métodos para manipular el genoma adenovírico. Los métodos para construir adenovirus modificados genéticamente están bien establecidos en el campo de la terapia génica y la viroterapia con adenovirus. El método más comúnmente utilizado se basa en construir primero la modificación genética deseada en un plásmido que contiene la región

adenovírica a modificar, y después realizar una recombinación homóloga en bacterias con un plásmido que contiene el resto del genoma vírico.

5 El adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa objeto de la presente invención se propaga y amplifica en líneas celulares normalmente utilizadas en el campo de la terapia génica y viroterapia, tales como las líneas HEK-293 y A549. El método preferente de propagación es por infección de una línea celular permisiva a la replicación del adenovirus. La línea de adenocarcinoma pulmonar A549 es un ejemplo de una línea con tales características. La propagación se realiza por ejemplo del siguiente modo: las células A549 se siembran en placas de cultivo celular de plástico y se infectan utilizando 100 partículas víricas por célula. Dos días después el efecto
10 citopático que refleja la producción de virus se observa como un agrupamiento y redondamiento de las células. Las células se recogen y se almacenan en tubos. Después de una centrifugación a 1000 g durante 5 minutos, el sedimento celular se congela y descongela tres veces para romper las células. El extracto celular resultante se centrifuga a 1000 g durante 5 minutos y el sobrenadante con virus se carga en un gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga durante 1 hora a 35000 g. La banda de virus obtenida del gradiente se carga de nuevo en otro
15 gradiente de cloruro de cesio y se centrifuga otra vez durante 16 horas a 35000 g. La banda de virus se recoge y se dializa frente a PBS-glicerol al 10%. El virus dializado se alícuota y mantiene a -80 °C. La cuantificación del número de partículas víricas y de unidades formadoras de placa se realiza siguiendo protocolos convencionales. La solución salina tamponada con fosfato (PBS) con glicerol al 5% es una formulación convencional para el almacenamiento de adenovirus. No obstante, se han descrito nuevas formulaciones que mejoran la estabilidad del virus. Los métodos de purificación del adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa para su utilización en el
20 tratamiento del cáncer, son los mismos que los descritos para otros adenovirus y vectores adenovíricos utilizados en viroterapia y terapia génica del cáncer.

25 El adenovirus oncolítico de la presente invención puede administrarse a un mamífero, preferentemente un humano. La intención de la administración del adenovirus oncolítico es terapéutica, incluyendo, pero sin limitación, melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de pulmón. Además, se contempla la administración del adenovirus oncolítico en una fase pre-maligno de un tumor.

30 Se entiende que el adenovirus oncolítico se administra en una forma farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la materia pueden cerciorarse de la dosis apropiada utilizando procedimientos convencionales. Se entiende que la dosis debe ser una cantidad eficaz del adenovirus oncolítico para que produzca una reducción del tumor en el paciente tratado. El virus se puede administrar de forma directa virus al tumor, en la cavidad donde se emplaza el tumor, en la vasculatura del tumor, alrededor del tumor o por la inyección endovenosa sistémica en el paciente. Preferentemente, la administración es sistémica.

35 Los protocolos para utilizar los virus descritos en la presente invención para el tratamiento del cáncer son los mismos procedimientos utilizados en los campos de la viroterapia con adenovirus y terapia génica con adenovirus. Existe una amplia experiencia en el uso de adenovirus no oncolíticos y oncolíticos en el campo de la terapia génica. Existen numerosas publicaciones que describen el tratamiento de células tumorales en cultivo, en modelos animales y en ensayos clínicos con pacientes. Para el tratamiento de células en cultivos *in vitro* el adenovirus purificado mediante cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente, se añade al medio de cultivo para
40 obtener la infección de las células tumorales. Para tratar tumores en modelos animales o en pacientes humanos, el adenovirus se puede administrar loco-regionalmente mediante inyección en el tumor o en una cavidad corporal donde se localiza el tumor, o bien por vía sistémica mediante inyección en la circulación sanguínea.

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

50 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado a los que entiende comúnmente una persona experta en la materia. En la práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden
55 excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Los objetivos, ventajas y características adicionales de la invención, serán evidentes para los expertos en la materia después de examinar la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Las siguientes realizaciones particulares y los dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 (a) muestra la estructura de adenovirus oncolíticos caracterizados por contener y expresar el gen de la

hialuronidasa PH20. El adenovirus AdwtRGD-PH20 contiene el gen de la proteína PH20 inserto detrás del gen de la fibra adenovírica. La expresión del gen de la proteína PH20 está regulada por el promotor principal tardío (MLP) del adenovirus mediante la inserción del aceptor de corte y empalme IIIa del adenovirus (SA), delante del gen de la proteína PH20. La traducción proteica de dicho gen está optimizada debido a la introducción de la secuencia kozac (K) antes de la secuencia de inicio de la traducción. Los adenovirus ICOVIR15 e ICOVIR17 son adenovirus que replican de forma selectiva en tumores. Se caracterizan por contener 4 sitios de unión a E2F y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1a. Además, ambos virus presentan una versión modificada de la fibra vírica en donde se ha insertado el péptido RGD-4C, y una versión mutante de la proteína E1A en donde se han deletado los aminoácidos 121-129 en la cadena polipeptídica (mutación $\Delta 24$). Además, ICOVIR17, contiene el gen de la hialuronidasa PH20, como en el adenovirus AdwtRGD-PH20. (b) muestra la secuencia insertada en el adenovirus Ad $\Delta 24$ RGD que sustituye la secuencia del nucleótido 419 al 422. Esta inserción se realiza para insertar cuatro sitios de unión al factor E2F-1 y un sitio de unión al factor Sp1. La secuencias subrayadas como "nt 385-419" y "nt 422-461" corresponden al tipo silvestre de Ad $\Delta 24$ RGD. (c) muestra el casete completo insertado en los genomas de ICOVIR17 y AdwtRGD-PH20, respecto a los genomas de ICOVIR15 y AdwtRGD (SEQ ID NO: 4). Se indican las secuencias aceptoras de corte y empalme IIIa, la de Kozac y la de poliadenilación (poliA). La secuencia que codifica la proteína PH20 se extiende desde la secuencia kozac hasta la secuencia de poliadenilación. La FIG. 1 se refiere al EJEMPLO 3.

La FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína PH20 (SEQ ID NO: 1) y una representación gráfica hidropática según el algoritmo de Kyte-Doolittle. La proteína PH20 es una proteína de membrana presente en las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides. (a) La secuencia aminoácidos muestra la secuencia hidrófoba responsable del anclaje de la proteína en la membrana (secuencia subrayada). En la presente invención, la proteína PH20 que expresan el virus, presenta una cola hidrófoba deletada. El punto de corte se indica dentro de un círculo. Por medio de esta deletación, la proteína PH20 se secreta al medio extracelular. (b) Representación hidropática de los últimos 100 aminoácidos de la proteína PH20 de acuerdo con Kyte-Doolittle. La flecha indica el inicio de la parte hidrófoba que se ha eliminado.

La FIG. 3 demuestra que los adenovirus oncolíticos que contienen el gen de la hialuronidasa PH20 expresan una proteína soluble que presenta actividad hialuronidasa. Los geles muestran que las muestras de ácido hialurónico incubadas con el sobrenadante de virus que expresa la hialuronidasa PH20 se han digerido produciendo oligosacáridos de distintos tamaños. Las muestras incubadas con los sobrenadantes de los adenovirus de control (AdwtRGD e ICOVIR15) presentan el ácido hialurónico sin digerir. La FIG. 3 corresponde al EJEMPLO 4.

La FIG. 4 demuestra que la inserción y expresión del gen de la hialuronidasa PH20 no interfiere con la replicación de un adenovirus replica de forma selectiva en tumor. Se infectaron células de las líneas celulares A549 (a) y SKMel28 (b) con los adenovirus oncolíticos ICOVIR15 e ICOVIR17 (que se diferencia de ICOVIR15 por contener el gen de la PH20) y se midió la cantidad de virus en los extractos celulares (virus total, eje X, en UT/ml) a distintos tiempos (eje Y, en horas post-infección). Las gráficas muestran como las cinéticas de producción de virus son idénticas para los dos virus, demostrando que la inserción y expresión del gen de la hialuronidasa PH20, en el adenovirus ICOVIR17, no afecta a la replicación del virus. La FIG. 4 corresponde al EJEMPLO 5.

La FIG. 5 muestra la eficacia oncolítica *in vitro* de un adenovirus oncolítico que contiene y expresa el gen de la hialuronidasa PH20. La capacidad oncolítica de un adenovirus que expresa la hialuronidasa PH20 (ICOVIR17) se comparó *in vitro* con la actividad de un virus oncolítico similar pero sin el gen de la hialuronidasa PH20 (ICOVIR15) en dos líneas celulares tumorales que expresan una elevada cantidad de ácido hialurónico, SKMel28 (a) y PC3 (b). El efecto citopático (ECP) que el virus induce se mide como una disminución de los niveles de proteína en una monocapa de células infectada (medido con el método BCA). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 10000 células por pocillo. Al día siguiente las células se infectaron con diluciones en serie del virus. Las células infectadas se incubaron durante 5 días, se lavaron con PBS y se midió la cantidad de proteína restante en el pocillo. Los resultados muestran que *in vitro*, la expresión de la hialuronidasa PH20 no mejora la actividad oncolítica del adenovirus, dado que las curvas de citotoxicidad fueron idénticas para los dos virus. Se representa el % de supervivencia celular frente a UT/célula. La FIG. 5 corresponde al EJEMPLO 5.

La FIG. 6 demuestra la actividad antitumoral *in vivo* de un adenovirus oncolítico que expresa la hialuronidasa PH20. Se inocularon células de melanoma humano (SKMel28) en cada flanco de ratones atímicos Balb/c. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 150 mm³, se inyectaron con PBS o 1x10⁸ unidades de transducción de AdwtRGD-PH20 (10 tumores/grupo). (a) El gráfico muestra el crecimiento tumoral promedio (en %) en cada grupo respecto al día 0 en función del tiempo posadministración (en días). El resultado demuestra que el adenovirus oncolítico que expresa el gen de la hialuronidasa PH20 presenta una capacidad antitumoral más elevada, estadísticamente significativa en comparación al grupo de control (PBS), p<0,00001. El 100 % de los tumores inyectados con el AdwtRGD-PH20 regresaron entre un 10 % y un 50 % del volumen en el día 27 posinyección, a diferencia de un 0 % de regresión en el grupo inyectado con PBS. (b) Al final del experimento se analizó por inmunohistoquímica la cantidad de ácido hialurónico en los tumores inyectados con PBS o AdwtRGD-PH20. Las imágenes muestran que los tumores inyectados con el AdwtRGD-PH20 presentan una cantidad de

ácido hialurónico inferior en comparación con los tumores de control. La FIG. 6 corresponde al EJEMPLO 6.1.

La FIG. 7 muestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 mejora el efecto antitumoral de un adenovirus oncolítico después de su administración intratumoral. Se inocularon células de melanoma humano (SKMel28) en cada flanco de ratones atímicos Balb/c. Una vez los tumores alcanzaron un volumen promedio de 130 mm³, los tumores se inyectaron con PBS o 1x10⁸ unidades de transducción de ICOVIR15 o ICOVIR17 (10 tumores/grupo) en una única dosis. (a) El gráfico muestra el crecimiento promedio de los tumores (en %) con respecto al día 0 en función del tiempo posadministración (en días). El adenovirus oncolítico que expresa la hialuronidasa PH20 (ICOVIR17) presenta un mejor efecto antitumoral que el adenovirus de control que no expresa esta hialuronidasa (ICOVIR15). (b) Después de 42 días de tratamiento, los ratones se sacrificaron y los tumores se recogieron y pesaron. La tabla muestra un resumen del volumen tumoral, porcentaje de crecimiento tumoral y peso de los tumores al final del experimento. Los tumores inyectados con ICOVIR17 presentan un peso tumoral significativamente inferior en comparación con los tumores inyectados con ICOVIR15 (* p<0,05) y con los tumores inyectados con PBS (# p<0,05). A diferencia de los resultados obtenidos *in vitro*, en donde los virus pueden propagarse sin dificultad a través de la monocapa de células, los resultados *in vivo* demuestran que en el interior de un tumor, en donde la matriz extracelular se opone a la correcta propagación del virus, la expresión de la hialuronidasa PH20 aumenta la potencia antitumoral de un adenovirus oncolítico. La FIG. 7 corresponde al EJEMPLO 6.2.

La FIG. 8 muestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 mejora el efecto antitumoral de un adenovirus oncolítico después de su administración sistémica. Se inocularon células de melanoma humano (SKMel28) en cada flanco posterior de ratones atímicos Balb/c. Una vez los tumores alcanzaron una promedio de 100 mm³, los ratones se inyectaron con PBS o 5x10¹⁰ partículas físicas de ICOVIR15 o ICOVIR17 (ICOVIR15 armado con PH20) (8-10 tumores/grupo) por vía endovenosa. (a) El gráfico muestra el crecimiento tumoral promedio (en %) de cada grupo respecto al día 0 en función del tiempo posadministración (en días). El resultado demuestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 da como resultado el aumento de la potencia oncolítica del adenovirus, dado que la supresión del crecimiento tumoral inducida por ICOVIR17 es significativamente más elevada que la supresión inducida en el grupo de control (ICOVIR15), * p<0,00001. (b) Las imágenes muestran la distribución de los adenovirus ICOVIR15 e ICOVIR17 dentro de los tumorales extraídos al final del experimento (día 48). Los tumores de los ratones inyectados con el adenovirus oncolítico ICOVIR17 muestran zonas necróticas muy extensas (flecha gruesa), un número reducido de zonas con células viables (v) y grandes y numerosos centros de replicación vírica (zonas con fluorescencia verde indicadas con flechas delgadas) en comparación con los tumores inyectados con el adenovirus de control, ICOVIR15. La FIG. 8 corresponde al EJEMPLO 6.3.

La FIG. 9 demuestra que el aumento de la actividad sistémica antitumoral de los adenovirus que expresan la enzima hialuronidasa PH20 no está restringido a un tipo tumoral. (a) El gráfico muestra el crecimiento promedio de tumores pancreáticos NP-18 (en %) de cada grupo respecto al día 0 en función del tiempo posadministración (en días). #, significa significativo (p ≤ 0,02) en comparación con los tumores tratados con PBS desde el día 14 al 30; &, significativo (p ≤ 0,05) en comparación con los tumores tratados con PBS desde el día 14 al 30; *, significativo (p ≤ 0,02) en comparación con los tumores tratados con ICOVIR-15 desde el día 12 al 30. (b) Las imágenes muestran la distribución de los adenovirus ICOVIR15 e ICOVIR17 en los tumores NP-18 en el día 30. *, p ≤ 0,01 comparado con los tumores tratados con ICOVIR15. "% de a.p." significa % de área positiva. La FIG. 9 corresponde al EJEMPLO 6.4.

La FIG. 10 (a) muestra la estructura de los adenovirus oncolíticos ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK. (b) muestra la secuencia de aminoácidos de la versión modificada de la fibra en ICOVIR17RGDK. La secuencia subrayada corresponde a los aminoácidos 91RGDK94 que son diferentes con respecto a la forma del tipo silvestre de la fibra del adenovirus humano tipo 5. La FIG. 10 corresponde al EJEMPLO 8.

La FIG. 11 muestra la capacidad oncolítica de los dos adenovirus (ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK) en dos líneas celulares tumorales, una de adenocarcinoma de pulmón A549 (a) y otra del adenocarcinoma de páncreas NP-18 (b). % de supervivencia celular frente a UT/célula. La FIG. 11 corresponde al EJEMPLO 9.

Ejemplos

EJEMPLO 1. Construcción de los adenovirus oncolíticos

Se construyeron dos adenovirus oncolíticos que contenían el gen de la hialuronidasa PH20: los adenovirus AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17.

El ADNc de la hialuronidasa PH20 se obtuvo mediante la amplificación por PCR de los distintos exones utilizando como molde el genoma de la línea celular A549, seguido de la unión de estos exones con cebadores flanqueantes específicos que contienen el sitio de restricción MfeI. El fragmento resultante se digirió con MfeI y se clonó mediante ligamiento en el plásmido lanzadera, pNKFiberRGD (que contiene la secuencia de la fibra del adenovirus

modificada con RGD), para producir el plásmido pNKFiberPH20. El ADNc correspondiente a la PH20 clonada en el plásmido pNKFiberPH20 está en la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 2 muestra los nucleótidos codificantes de la proteína PH20 (isoforma con número de acceso de GenBank NP_694859.1) desde el codón de inicio (ATG) hasta la posición 1467. La secuencia nucleotídica de la región 1468 a la 1527 de esta secuencia de GenBank codifica la cola hidrófoba de la proteína que ancla la proteína a la membrana. Esta secuencia se ha deletado y no aparece en la SEQ ID NO: 2. Después del nucleótido 1468 se ha añadido el codón de terminación de la traducción TAA.

EJEMPLO 2. Construcción del adenovirus AdwtRGD-PH20: Para generar el adenovirus AdwtRGD-PH20, el gen de la fibra adenovírica del plásmido pVK50cau (que contiene la secuencia completa del Ad5 con un sitio de restricción Swal en la fibra) se reemplazó utilizando recombinación homóloga en levaduras, por el gen de la fibra seguido del gen de la hialuronidasa PH20 obtenido del plásmido pNKFiberPH20 digerido con NotI/KpnI.

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

EJEMPLO 3. Construcción del adenovirus ICOVIR17: Para generar este adenovirus se utilizó el plásmido adenovirico pICOVIR17. Para generar este plásmido, el gen de la fibra del adenovirus del plásmido pICOVIR15 se reemplazó por recombinación homóloga en levaduras por el gen de la fibra seguido del gen de la hialuronidasa PH20 del plásmido pAdwtRGD-PH20 digerido con SpeI/PacI.

5 El adenovirus ICOVIR15, proviene del adenovirus Ad Δ 24RGD que se caracteriza por contener la deleción Δ 24 en la secuencia codificante de la proteína E1a. Esta deleción afecta a la interacción de E1a con pRB. Ad Δ 24RGD también tiene la inserción del péptido RGD en la fibra adenovirica, para aumentar la infectividad del virus. Estas dos modificaciones se describen en K. Suzuki *et al.*, "Conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency", *Clin Cancer Res* 2001, vol. 7, pág. 120-6. A partir de Ad Δ 24RGD, se insertaron cuatro sitios de unión a E2F-1 y un sitio de unión a Sp1 en el promotor endógeno de E1a para controlar la expresión de E1a. De este modo se obtiene ICOVIR15. Esta inserción se realizó mediante el reemplazo de la secuencia

10 419-422 del genoma por la secuencia con los 4 sitios de unión a E2F-1 y un sitio de unión a Sp1, de manera que la secuencia final es la que aparece en la SEQ ID NO: 3 y la FIG. 1 (b). Para realizar esta etapa se creó un sitio único de restricción para BsiWI por mutagénesis dirigida en el promotor E1A del plásmido pEndK/Spe (*cf.* J.E. Carette *et al.*, "Conditionally replicating adenoviruses expressing short hairpin RNAs silence the expression of a target gene in cancer cells", *Cancer Res* 2004, vol. 64, pág. 2663-7). El sitio de unión a Sp1 se introdujo en el plásmido pEndK/Spe en el sitio BsiWI mediante el ligamiento de este plásmido cortado con BsiWI con los cebadores Sp1F (5'-GTACGTCGACCACAAACCCCGCCAGCGTCTTGTCATTGGCGTCGACGCT-3' SEQ ID NO: 5) y Sp1R (5'-GTACAGCGTCGACGCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGTTTGTGGTCGAC-3' SEQ ID NO: 6) hibridados entre sí. Los sitios de unión a E2F se introdujeron utilizando los cebadores de unión E2FF2 (5'-GTACGTCGGCGGCTCGTGGCTCTTTTCGCGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGGTTCGAA-3' SEQ ID NO: 7) y E2FR2 (5'-GTA CTT CGAACCACTTTTACGCGCAAATCCTTTTTGCCGCGAAAGAGCCACGAGCCGC CGAC-3' SEQ ID NO: 8) hibridados entre sí, para crear el plásmido pEndK415Sp1E2F2. A continuación se introdujo por recombinación homóloga en levaduras la secuencia CAU, que contiene los elementos necesarios para la replicación del plásmido en levaduras (un centrómero, la región de replicación autónoma ARS y el marcador de selección URS3) para crear el plásmido pEndK415Sp1E2F2CAU. Para finalizar, se realizó una recombinación homóloga en levaduras del plásmido pEndK415Sp1E2F2CAU digerido con KpnI y el genoma de adenovirus del adenovirus Ad Δ 24RGD para construir pICOVIR15cau. ICOVIR15 se obtuvo por transfección de pICOVIR15cau digerido con PacI en células HEK293.

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

En la FIG. 1 se muestra el casete completo insertado en los genomas de ICOVIR17 y AdwtRGD-PH20 en comparación con los genomas de ICOVIR15 y AdwtRGD (c) y en la SEQ ID NO: 4: La secuencia que codifica la proteína PH20 está entre la secuencia kozac y la secuencia de poliadenilación.

EJEMPLO 4. Expresión de una proteína soluble con actividad hialuronidasa por un adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa PH20

45 Para demostrar que un adenovirus que contiene el gen de la hialuronidasa PH20 expresa una proteína soluble con actividad hialuronidasa, se infectaron cultivos de la línea celular A549 con los virus AdwtRGD, AdwtRGD-PH20, ICOVIR15 o ICOVIR17, utilizando una multiplicidad de infección que permitía más del 80 % de infección (M.O.I 20). 24 h posinfección, el medio de infección se reemplazó por medio recién preparado. Después, tras 24 h adicionales, el medio recién preparado (o sobrenadante) se recogió y se concentró por filtración en una columna de Amicon Extreme (Millipore, Billerica, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes concentrados se incubaron durante una noche a 37 °C con una solución de ácido hialurónico (1,5 mg/ml) en tampón fosfato (pH=6) que contenía NaCl 0,1 M y BSA al 0,05 %. El ácido hialurónico digerido se analizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15 % (*cf.* M. Ikegami-Kawai *et al.*, "Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity", *Analytical biochemistry* 2002, vol. 311, pág. 157-65). Los oligosacáridos resultantes de la digestión del ácido hialurónico se fijaron en la matriz del gel en una solución de azul alcian durante 30 min. Para finalizar, los oligosacáridos se tiñeron con nitrato de plata. El resultado se muestra en la FIG. 3. Los resultados demuestran que el sobrenadante de las células infectadas con adenovirus que contienen el gen de la hialuronidasa PH20 (AdwtRGD-PH20 e ICOVIR17) contiene una proteína soluble capaz de digerir ácido hialurónico (un polisacárido de elevado peso molecular) en oligosacáridos de 5 hasta más de 50 unidades repetidas de disacáridos.

EJEMPLO 5. Ausencia de efecto en la replicación de virus y en la citotoxicidad *in vitro* mediadas por el adenovirus oncolítico que expresa el gen de la hialuronidasa PH20

- Para comprobar que la inserción del gen de la hialuronidasa PH20 no afectaba a la replicación de virus, se infectaron las líneas celulares tumorales A549 y SKMel-28 con los adenovirus oncolíticos ICOVIR15 o ICOVIR17. Cuatro horas posinfección, el medio de infección se reemplazó por medio recién preparado. Los extractos celulares totales se recogieron a distintos tiempos posinfección y se congelaron y descongelaron tres veces para liberar el virus. La cantidad de virus en el extracto celular se determinó por infección de HEK293 y tinción anti hexon (*cf.* M. Majem citado anteriormente). El resultado se muestra en la FIG. 4. La inserción del gen de la hialuronidasa PH20 no afecta a la replicación del adenovirus ICOVIR17, dado que este virus muestra la misma replicación que el adenovirus de control.
- 10 Para demostrar el efecto de la expresión de la hialuronidasa PH20 en la citotoxicidad del adenovirus oncolítico *in vitro*, se infectaron células de las líneas celulares tumorales PC3 y SKMel-28 con diluciones en serie de los virus ICOVIR15 o ICOVIR17. Cinco y seis días posinfección, respectivamente, se evaluó en un espectrofotómetro la cantidad de proteína como un indicador de supervivencia celular. Los resultados se muestran en la FIG. 5. La actividad lítica de ICOVIR17 en estas dos líneas tumorales es la misma que la actividad de ICOVIR15, indicando que la expresión de la hialuronidasa PH20 no ofrece ninguna ventaja oncolítica *in vitro*.

EJEMPLO 6. Utilización de un adenovirus replicativo que contiene el gen de la hialuronidasa PH20 para tratar tumores de forma eficaz

- 20 6.1. Se realizó un experimento *in vivo* utilizando ratones atímicos de la cepa Balb/c con SKMel-28 injertados. Un total de 5×10^6 células tumorales de la línea celular SKMel-28 se inyectaron por vía subcutánea en cada flanco del ratón. Después de 21 días los ratones con tumores (con un volumen tumoral de 150 mm^3) se distribuyeron en distintos grupos experimentales (n=10 por grupo). Los tumores del grupo control recibieron una única inyección intratumoral de tampón salino (20 μl). Los ratones del grupo tratado con AdwtRGD-PH20 recibieron una inyección intratumoral (20 μl) de 1×10^8 unidades de transducción de este virus por tumor (equivalente a 2×10^9 partículas víricas o pv). Los tumores se midieron cada dos o tres días con un calibrador y el volumen tumoral se calculó de acuerdo con la fórmula: $V (\text{mm}^3) = A (\text{mm}) \times B^2 (\text{mm}^2) \times \pi/6$, en donde A es la longitud mayor o longitudinal, y B es la longitud transversal. La FIG. 6 muestra el porcentaje de crecimiento tumoral con respecto al inicio del tratamiento (día 0). Los resultados se muestran como el promedio \pm D.T. La significación estadística de las diferencias entre los resultados se calculó utilizando una prueba no paramétrica de datos no apareados de Mann-Whitney. Las curvas de crecimiento se compararon usando un análisis de la variancia. Los resultados se consideraron significativos si $p < 0,05$. El tratamiento de los tumores con el adenovirus AdwtRGD-PH20 produjo regresiones tumorales en el 100 % de los tumores tratados. El % de crecimiento tumoral fue significativamente menor en comparación con el grupo de control desde los primeros días posinyección. El análisis de los tumores al final del experimento mostró una reducción de la cantidad de ácido hialurónico presente en la matriz extracelular de los tumores inyectados con el AdwtRGD-PH20.

- 40 6.2. En otro experimento, el tratamiento se realizó por inyección intratumoral de ICOVIR15 o ICOVIR17. Se implantaron tumores de la línea celular de melanoma humano SKMel-28 en ratones atímicos Balb/C nu/nu, y una vez establecidos, se trataron por vía intratumoral PBS o 1×10^8 unidades de transducción de los virus ICOVIR15 o ICOVIR17 (equivalente a 2×10^9 partículas víricas o pv). Los resultados se muestran en la FIG. 7. El tratamiento con ICOVIR17 mostró una actividad oncolítica que resultó en una inhibición del crecimiento tumoral significativamente distinta al grupo de control (PBS), $p < 0,05$. Al final del experimento los tumores se extrajeron y se pesaron. La tabla de la FIG. 7 muestra los promedios de volumen tumoral, el porcentaje de crecimiento tumoral y el peso de los tumores al final del experimento. El peso de los tumores inyectados con ICOVIR17 es significativamente inferior al peso de los tumores tratados con los grupos de control, PBS (# $p < 0,05$) e ICOVIR15 (* $p < 0,05$).

- 50 6.3. En otro experimento el tratamiento se realizó por inyección sistémica de ICOVIR15 o ICOVIR17. Se implantaron tumores de la línea celular de melanoma humano SKMel-28 en ratones atímicos Balb/C nu/nu y, una vez establecidos, se trataron a través de inyección en la vena de la cola con PBS o 5×10^{10} partículas físicas del virus ICOVIR15 o ICOVIR17. Los resultados se muestran en la FIG. 8. El tratamiento con ICOVIR17 demostró una actividad oncolítica que resultó en una supresión del crecimiento tumoral significativamente distinta de los grupos de control, PBS (# $p < 0,0001$) e ICOVIR15 (* $p < 0,00001$). Al final el experimento los tumores se extrajeron y se congelaron en OCT. Las distintas secciones de los tumores congelados en OCT se trataron con un anticuerpo α -hexon (proteína de la cápside del adenovirus) y se contratiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol. La actividad antitumoral de ICOVIR17 correlaciona con la replicación del adenovirus a nivel intratumoral, la cual se evaluó en los tumores obtenidos el día 48 postinyección. Los tumores tratados con ICOVIR17 presentan grandes zonas necróticas, una mejor distribución vírica y menos zonas de células viables que los tumores inyectados con ICOVIR15.

- 60 6.4. En otro experimento el tratamiento se realizó por inyección sistémica de ICOVIR15 o ICOVIR17 en ratones atímicos Balb/C nu/nu donde se habían implantado tumores de la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano NP-18. Una vez establecidos los tumores, alcanzando un volumen promedio de 60 mm^3 , los animales se trataron a través de la vena de la cola con PBS o 5×10^{10} partículas físicas de los virus ICOVIR15 e ICOVIR17

(10 tumores/grupo). Los resultados se muestran en la FIG. 9, en donde se demuestra que el aumento de la actividad antitumoral de un adenovirus que expresa la enzima hialuronidasa PH20 no está restringido a un único tipo tumoral.

- 5 La FIG. 9 (a) demuestra que la expresión de la hialuronidasa PH20 también resulta en un aumento de la potencia oncolítica del adenovirus, en comparación con el grupo de PBS y con el grupo de control de virus (ICOVIR15). # significa significativo ($p \leq 0,02$) en comparación con los tumores tratados con PBS desde el día 14 al 30; & significa significativo ($p \leq 0,05$) en comparación con los tumores tratados con PBS desde el día 14 al 30; * significa significativo ($p \leq 0,02$) en comparación con los tumores tratados con ICOVIR15 desde el día 12 al 30. En el día 30,
10 los tumores se extrajeron y congelaron en OCT, y más tarde se trataron con un anticuerpo α -hexon y se contratiñeron con DAPI.

- Para cuantificar el nivel de replicación intratumoral del ICOVIR-17, se analizaron por tinción anti hexon cinco zonas viables de cada uno de los tumores (7/10 animales por grupo) y se midió el porcentaje de zona positiva mediante
15 análisis por imagen informatizado (programa informático ImageJ). Los resultados de este análisis se muestran en la FIG. 9 (b) en donde se observa que los tumores de NP-18 tratados con ICOVIR17 presentan una zona significativamente más grande de tinción de adenovirus comparado con los tumores tratados con ICOVIR15 (*, significativo $p \leq 0,01$).

20 EJEMPLO 7. Perfil toxicológico de los adenovirus oncolíticos que expresan el gen de la hialuronidasa

- Para comprobar que la inserción del gen de la hialuronidasa no modifica de forma substancial el patrón de toxicidad inducido por los adenovirus oncolíticos después de la administración endovenosa, se utilizaron
25 hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*) dado que este es un modelo animal permisivo para la replicación del adenovirus humano. El hámster constituye un modelo animal permisivo para la replicación del adenovirus humano. Se utilizaron animales hembras inmunocompetentes de 5 semanas de edad (5-6 animales/grupo). Estos recibieron una única dosis de 4×10^{11} pv de ICOVIR15 o ICOVIR17 por vía intravenosa a través de la vena cefálica en el día 0 en 300 μ l de PBS. El grupo de control se inyectó con el mismo volumen. Cinco días después de la administración, los animales se sacrificaron y se obtuvo de cada uno sangre total y suero mediante punción
30 cardiaca, para medir parámetros de toxicidad hepática (enzimas AST y ALT) y para hacer el recuento de las distintas poblaciones de células sanguíneas mediante citometría de flujo (hemograma). De forma simultánea se obtuvieron los hígados de los animales y se fijaron en paraformaldehído al 4% para la tinción con hematoxilina/eosina.

- 35 Los resultados del estudio de toxicidad hepática indicaron que ambos virus inducen un cierto grado de inflamación hepática en este modelo, con una elevación de los niveles de las transaminasas AST y ALT. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los animales tratados con ICOVIR15 o ICOVIR17. A nivel hematológico, ambos virus provocaban elevaciones de las poblaciones de neutrófilos, basófilos y monocitos, así como recuentos plaquetarios reducido respecto a los animales de control, pero otra vez sin diferencias entre ICOVIR15 e ICOVIR17.

40 EJEMPLO 8. Construcción del virus ICOVIR17RGDK

- Para generar este adenovirus se utilizó el plásmido adenovirico pICOVIR17RGDK. En este plásmido el gen de la fibra del adenovirus tipo 5 del tipo silvestre se reemplazó por una versión modificada en su dominio de unión a
45 heparán-sulfato (aminoácidos 91KTK94 de la secuencia polipeptídica reemplazados por 91RGDK94). El plásmido pICOVIR17RGDK se construyó por una recombinación homóloga en levaduras, entre el producto de la digestión parcial de pICOVIR17 con NdeI y el plásmido pBSattKKT digerido con EcoRI (que contiene la versión modificada de la fibra del adenovirus y que se describe en N. Bayo *et al.* "Replacement of adenovirus type 5 fiber shaft heparan sulfate proteoglycan-binding domain with RGD for improved tumor infectivity and targeting". Human Gene Therapy
50 2009, vol. 20, pág. 1214-21).

- La FIG. 10 muestra la posición de la modificación 91RGDK94 en el contexto de ICOVIR17RGDK, así como la secuencia completa de la proteína fibra en este adenovirus. El adenovirus ICOVIR17 contiene una versión del gen de la fibra del adenovirus en donde se ha insertado el péptido RGD-4C (Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys se
55 ha insertado; CDCRGDCFC, SEQ ID NO: 10) en el bucle HI del dominio de la "cabeza" de la proteína (un bucle hipervariable no conservado evolutivamente y muy expuesto en la cápside del adenovirus). ICOVIR17RGDK es totalmente análogo a ICOVIR17 excepto en el gen de la fibra, dado que la fibra del ICOVIR17RGDK solo difiere del adenovirus humano tipo 5 del tipo silvestre en el reemplazo de los aminoácidos ⁹¹KTK⁹⁴ por el péptido de unión a integrina de alta afinidad ⁹¹RGDK⁹⁴, en el dominio del "tallo" de la proteína (SEQ ID NO: 9).

60 EJEMPLO 9. Eficacia oncolítica del adenovirus con la modificación de la cápside ICOVIR17RGDK

Como se muestra en la FIG. 11, la modificación de la cápside presente en ICOVIR17RGDK no modifica la citotoxicidad *in vitro* de un adenovirus oncolítico que contiene y expresa el gen de la hialuronidasa PH20. La

capacidad oncolítica de dos adenovirus que expresan la hialuronidasa PH20 (ICOVIR17 y ICOVR17RGDK) se compararon en dos líneas celulares tumorales, A549 obtenida de adenocarcinoma de pulmón (FIG. 11 (a)) y NP-18 obtenida de adenocarcinoma de páncreas (FIG. 11 (b)). El efecto citopático que induce el virus se mide como una disminución de la cantidad de proteína en una monocapa celular infectada (método BCA). Las células de las dos líneas celulares tumorales se sembraron en placas de 96 pocillos a 10000 células/pocillo. Al día siguiente las células se infectaron con diluciones en serie de virus. Las células infectadas se incubaron durante 6 días, se lavaron con PBS y se midió la cantidad de proteína restante en el pocillo. Los resultados muestran que *in vitro*, la modificación de la cápside no cambia de forma significativa la actividad oncolítica de los adenovirus.

10

EJEMPLO 10. Distinto perfil toxicológico de los adenovirus oncolíticos que expresan el gen de la hialuronidasa

Para evaluar el impacto de la modificación RGDK en el contexto de los adenovirus oncolíticos que expresan hialuronidasa, se utilizaron ratones inmunocompetente Balb/C sin tumor. Se utilizaron machos de 6 semanas de edad (7 animales/grupo). Recibieron una única dosis de 5×10^{10} pv of ICOVIR17 o ICOVIR17RGDK por vía intravenosa a través de la vena de la cola en el día 0 en 150 μ l de PBS. En el día 7 (2 animales/grupo) y día 12 (5 animales/grupo) posadministración, los animales se sacrificaron y de cada uno de ellos se obtuvo sangre total y suero mediante punción cardíaca, para proceder al recuento de las distintas poblaciones de células sanguíneas mediante citometría de flujo (hemograma) y para medir parámetros de toxicidad hepática (enzimas AST y ALT). El resultado de este estudio mostró que ambos virus aumentaban los niveles de enzimas en el día 7. Sin embargo, éstos niveles vuelven a los valores normales en día 12. No se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de ICOVIR17 e ICOVIR17RGDK, aunque se observó una tendencia a una hepatotoxicidad más baja en el grupo de animales a las que se les inyectó ICOVIR17RGDK, en comparación con el grupo de ICOVIR17 (niveles ligeramente más bajos de AST y ALT). En cuanto al perfil hematológico de los animales en el día 12 posadministración, no se observaron diferencias significativas en el recuento de la serie blanca y en el plaquetario, excepto en el número de linfocitos, que era más bajo en los animales tratados con ICOVIR17 que en los animales de los grupos de PBS e ICOVIR17RGDK.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> FUNDACIO PRIVADA INSTITUT D\222INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVITGE
INSTITUT CATALA D\222NCOLOGIA

25 <120> Adenovirus oncolíticos para el tratamiento del cáncer

<130> AVCRI90G PCT

30 <150> ES200901201
<151> 06-05-2009

<160> 10

35 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 509
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 1

ES 2 600 955 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 600 955 T3

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 600 955 T3

Gly Val Cys Ile Arg Lys Asn Trp Asn Ser Ser Asp Tyr Leu His Leu
385 390 395 400

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
<211> 1473
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> ADNc de la proteína PH20 desde el inicio de la transcripción (ATG) hasta la posición 1467. La cola hidrófoba de la proteína (nucleótidos 1468-1527) se ha deletado y no se muestra. El codón de terminación (TAA) se ha añadido al final.

<400> 2
atgggagtg taaaattcaa gcacatcttt ttcagaagct ttgttaaate aagtggagta 60
tcccagatag tttcacctt ccttctgatt ccatgttgct tgactctgaa tttcagagca 120
cctcctgtta ttccaaatgt gcctttctc tgggcctgga atgccccaaag tgaattttgt 180
cttgaaaaat ttgatgagcc actagatatg agcctcttct ctttcatagg aagccccoga 240
ataaacgcca ccgggcaagg tgttacaata ttttatgttg atagacttgg ctactatcct 300
tacatagatt caatcacagg agtaactgtg aatggaggaa tccccagaa gatttcotta 360
caagaccatc tggacaaagc taagaaagac attacatctt atatgccagt agacaatttg 420
ggaatggctg ttattgactg ggaagaatgg agaccactt gggcaagaaa ctggaaacct 480

15

ES 2 600 955 T3

```

aaagatgttt acaagaatag gtctattgaa ttggttcagc aacaaaatgt acaacttagt      540
ctcacagagg ccaactgagaa agcaaaaacaa gaatttgaaa aggcagggaa ggatttcctg      600
gtagagacta taaaattggg aaaattactt cggcceaate acttgtgggg ttattatctt      660
tttccggatt gttacaacca tcactataag aaaccocggtt acaatggaag ttgcttcaat      720
gtagaaataa aaagaaatga tgatctcagc tggttgtgga atgaaagcac tgctctttac      780
ccatccattt atttgaacac tcagcagtct cctgtagctg ctacactcta tgtgcgcaat      840
cgagttcggg aagccatcag agtttccaaa atacctgatg caaaaagtcc acttccggtt      900
tttgcatata cccgcatagt ttttactgat caagttttga aattcctttc tcaagatgaa      960
cttgtgtata catttggcga aactggtgct ctgggtgctt ctggaattgt aatatgggga     1020
accctcagta taatgcgaag tatgaaatct tgcttgctcc tagacaatta catggagact     1080
atactgaatc cttacataat caacgtcaca ctagcagcca aatgtgtag ccaagtgctt     1140
tgccaggagc aaggagtgtg tataaggaaa aactggaatt caagtgacta tcttcacctc     1200
aaccagata attttgctat tcaacttgag aaaggtggaa agttcacagt acgtggaaaa     1260
ccgacacttg aagacctgga gcaattttct gaaaaatfff attgcagctg ttatagcacc     1320
ttgagttgta aggagaaaagc tgatgtaaaa gacactgatg ctgttgatgt gtgtattgct     1380
gatggtgtct gtatagatgc ttttctaaaa cctcccatgg agacagaaga acctcaaatt     1440
ttctacaatg cttcaccctc cacactatct taa                                     1473

```

<210> 3
 <211> 246
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia incorporada en el adenovirus Addelta24RGD que reemplaza su secuencia desde el nucleótido 419 al 422. Los primeros nucleótidos 1-30 y los últimos 208-246 son procedentes del Addelta24RGD del tipo silvestre.

10

<400> 3

```

ccagggtgttt ttctcagggtg ttttccgcgt actcggcggc tcgtggctct ttcgcggcaa      60
aaaggatttg gcgcgtaaaa gtggttcgaa gtactcggcg gctcgtggct cttcgcggc      120
aaaaaggatt tggcgcgtaa aagtggttcg aagtacgtcg accacaaaacc ccgcccagcg      180
tcttgtcatt ggcgtcgacg ctgtacgggg tcaaagttgg cgttttatta ttatagtcag      240
ctgacg                                     246

```

15

<210> 4
 <211> 1508
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <223> Casete completo integrado en los genomas de IC0VIR17 y AdwtRGD-PH20 con respecto a los genomas de IC0VIR15 y AdwtRGD.

25

<400> 4

ES 2 600 955 T3

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

5 <210> 5
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido SpIF

<400> 5
 gtacgtcgac caciaacccc gccagcgtc ttgtcattgg cgtcgacgct 50

15 <210> 6
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 600 955 T3

	<220>		
	<223> oligonucleótido SpIR		
5	<400> 6		
	gtacagcgtc gacgccaatg acaagacgct gggcgggggtt tgtggtcgac		50
	<210> 7		
	<211> 63		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido E2FF2		
15	<400> 7		
	gtacgtcggc ggctcgtggc tcttcgctgg caaaaaggat ttggcgcgta aaagtggctc		60
	gaa		63
	<210> 8		
	<211> 63		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
20	<220>		
	<223> oligonucleótido E2FR2		
	<400> 8		
	gtacttcgaa ccacttttac ggcgcaaadc cttttgctcg cgaaagagcc acgagccgcc		60
30	gac		63
	<210> 9		
	<211> 582		
	<212> PRT		
35	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia de aminoácidos, aminoácidos 1-582, de la versión modificada de la fibra en ICOVIR17RGDK		
40	<400> 9		

ES 2 600 955 T3

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

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
 20 25 30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
 35 40 45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
 50 55 60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
 65 70 75 80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Arg Gly Asp Lys Ser Asn
 85 90 95

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

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
 115 120 125

Met Gly Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
 130 135 140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
 165 170 175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
 180 185 190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
 195 200 205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
 210 215 220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gly Thr Lys Val Thr

ES 2 600 955 T3

225 230 235 240
 Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
 245 250 255
 Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
 260 265 270
 Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
 275 280 285
 Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
 290 295 300
 Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
 305 310 315
 Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
 325 330 335
 Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
 340 345 350
 Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Ile Gly His Gly Leu Glu Phe
 355 360 365
 Asp Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe
 370 375 380
 Asp Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu
 385 390 395
 Thr Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Asp Leu Asn Ala
 405 410 415
 Glu Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln
 420 425 430
 Ile Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro
 435 440 445
 Ile Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu
 450 455 460
 Asn Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn

ES 2 600 955 T3

```
465                               470                               475                               480
Phe Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val
                               485                               490                               495
Gly Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr
                               500                               505                               510
Ala Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr
                               515                               520                               525
Lys Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly
                               530                               535                               540
Asp Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser
545                               550                               555                               560
Gly His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe
                               565                               570                               575
Ser Tyr Ile Ala Gln Glu
                               580
```

<210> 10

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> péptido RGD-4C que se inserta en la región HI de la fibra adenovírica

<400> 10

```
Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys
1                               5
```

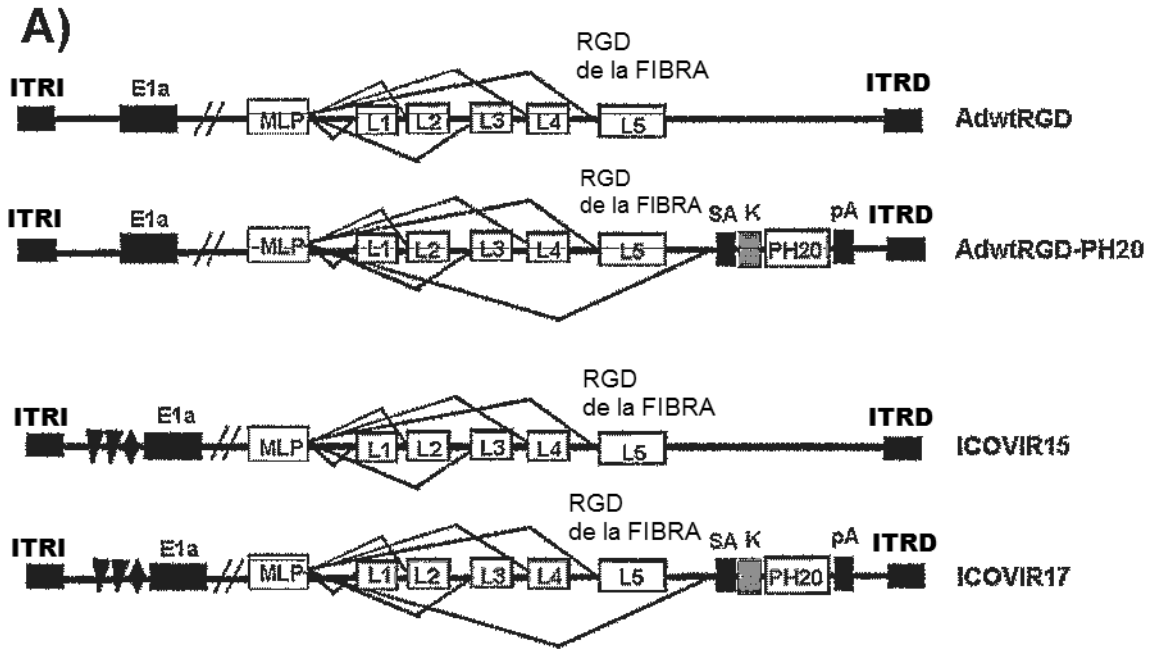

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un adenovirus oncolítico que comprende una secuencia que codifica una enzima hialuronidasa insertada en su genoma.
2. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el adenovirus es un adenovirus humano.
3. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el adenovirus humano es de serotipo 5.
- 10 4. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la enzima hialuronidasa es una hialuronidasa testicular de mamífero.
5. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enzima hialuronidasa es hialuronidasa testicular humana.
- 15 6. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la secuencia de la enzima tiene la secuencia del dominio de unión a membrana eliminada, dando como resultado una enzima soluble.
- 20 7. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la secuencia de la enzima está insertada en el adenovirus oncolítico después de la secuencia de nucleótidos de la fibra del adenovirus.
8. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la expresión de la enzima está controlada por un promotor activo en células animales.
- 25 9. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor del citomegalovirus, el promotor principal tardío del adenovirus, el promotor de SV40, el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple, el promotor de RSV, el promotor EF1 alfa, el promotor de la beta-actina, el promotor de la IL-2 humana, el promotor de la IL-4 humana, el promotor del IFN, el promotor E2F y el promotor del GM-CSF humano.
- 30 10. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el adenovirus comprende un promotor específico de tejido o uno específico de tumor, en el que el promotor controla la expresión de uno o más genes del grupo de E1a, E1b, E2 y E4, para obtener replicación selectiva en tumores.
- 35 11. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el promotor se selecciona del grupo que consiste en el promotor E2F, el promotor de la telomerasa hTERT, el promotor de la tirosinasa, el promotor del antígeno específico de próstata, el promotor de la alfafetoproteína y el promotor de la COX-2.
- 40 12. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el adenovirus tiene mutaciones en uno o más genes seleccionados del grupo de E1a, E1b, E4 y ARN-AV, para obtener replicación selectiva en tumores.
- 45 13. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el adenovirus tiene modificaciones en la cápside para aumentar su infectividad o para dirigirlo a un receptor presente en una célula tumoral.
- 50 14. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la modificación de la cápside es el reemplazo del dominio de unión a heparán sulfatos KKTK, presente en la fibra adenovírica, por el dominio RGDK.
15. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el adenovirus comprende una secuencia que optimiza la traducción a proteína de la secuencia que codifica la hialuronidasa.
- 55 16. El adenovirus oncolítico de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el adenovirus comprende una secuencia que promueve la expresión de la secuencia que codifica la hialuronidasa y, de forma más específica, tal secuencia se selecciona del grupo que consiste en una secuencia aceptora de corte y empalme que permite el procesamiento del ARN, una secuencia IRES y la secuencia 2A de picornavirus.
- 60 17. El adenovirus oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el adenovirus comprende uno o más genes insertados en su genoma.
18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del adenovirus oncolítico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-17, junto con transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

19. Uso del adenovirus oncolítico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-17, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o un estado pre-maligno del cáncer, en un mamífero que incluye un ser humano.

5

FIG. 1



B)

CCAGGTGTTTTTCTCAGGTGTTTTCCGCGTACTCGGCGGCTCGTGGCTC

nt 385-419

TTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGGTTCGAAGTACTCGG

E2F-1

E2F-1

CGGCTCGTGGCTCTTTCGCGGCAAAAAGGATTTGGCGCGTAAAAGTGGT

E2F-1

E2F-1

TCGAAGTACGTCGACCACAAACCCCGCCCAGCGTCTTGTCAATTGGCGTC

Sp1

GACGCTGTACGGGGTCAAAGTTGGCGTTTTATTATTATAGTCAGCTGAG

nt 422-461

FIG. 1

C)

IIIa

K

TACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGGGAGTGCTAAAATTCA
 AGCACATCTTTTCAGAAGCTTTGTTAAATCAAGTGGAGTATCCCAGATA
 GTTTTCACCTTCCTTCTGATTCCATGTTGCTTGACTCTGAATTCAGAGCA
 CCTCCTGTTATTCCAAATGTGCCTTTCCTCTGGGCCTGGAATGCCCAAG
 TGAATTTTGTCTTGGAAAATTTGATGAGCCACTAGATATGAGCCTCTTCTC
 TTTCATAGGAAGCCCCGAATAAACGCCACCGGGCAAGGTGTTACAATAT
 TTTATGTTGATAGACTTGGCTACTATCCTTACATAGATTCAATCACAGGAG
 TAACTGTGAATGGAGGAATCCCCAGAAGATTTCTTACAAGACCATCTG
 GACAAAGCTAAGAAAGACATTACATTTTATATGCCAGTAGACAATTTGGG
 AATGGCTGTTATTGACTGGGAAGAATGGAGACCCACTTGGGCAAGAAAC
 TGGAACCTAAAGATGTTTACAAGAATAGGTCTATTGAATTGGTTCAGCA
 ACAAATGTACAACCTTAGTCTCACAGAGGCCACTGAGAAAGCAAACAAG
 AATTTGAAAAGGCAGGGAAGGATTTCTGGTAGAGACTATAAAATTGGGA
 AAATTACTTCGGCCAAATCACTTGTGGGGTTATTATCTTTTTCCGGATTGT
 TACAACCATCACTATAAGAAACCCGGTTACAATGGAAGTTGCTTCAATGT
 AGAAATAAAAAGAAATGATGATCTCAGCTGGTTGTGGAATGAAAGCACTG
 CTCTTTACCCATCCATTTATTTGAACACTCAGCAGTCTCCTGTAGCTGCTA
 CACTCTATGTGCGCAATCGAGTTCGGGAAGCCATCAGAGTTTCCAAAATA
 CCTGATGCAAAAAGTCCACTTCCGGTTTTTGCATATACCCGCATAGTTTTT
 ACTGATCAAGTTTTGAAATTCCTTTCTCAAGATGAACTTGTGTATACATTT
 GGCGAAACTGTTGCTCTGGGTGCTTCTGGAATTGTAATATGGGGAACCC
 TCAGTATAATGCGAAGTATGAAATCTTGCTTGCTCCTAGACAATTACATG
 GAGACTATACTGAATCCTTACATAATCAACGTCACACTAGCAGCCAAAAT
 GTGTAGCCAAGTGCTTTGCCAGGAGCAAGGAGTGTGTATAAGGAAAAAC
 TGGAATTCAAGTGACTATCTTCACCTCAACCCAGATAATTTTGCTATTCAA
 CTTGAGAAAGGTGGAAAGTTCACAGTACGTGGAAAACCGACACTTGAAG
 ACCTGGAGCAATTTTCTGAAAAATTTTATTGCAGCTGTTATAGCACCTTGA
 GTTGTAAGGAGAAAGCTGATGTAAGACACTGATGCTGTTGATGTGTGT
 ATTGCTGATGGTGTCTGTATAGATGCTTTTCTAAACCTCCCATGGAGAC
 AGAAGAACCTCAAATTTTCTACAATGCTTCACCCTCCACACTATCTTAATA
AA

poliA

FIG. 2

A)

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAW
 NAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGVTFIFYVDRLGYYPYIDSITG
 VTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNW
 KPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVETIKLGKLLR
 PNHLWGYLFPDCYNHHYKPGYNGSCFNVEIKRNDL SWLWNESTALYP
 SIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKF
 LSQDELVYTFGETVALGASGIVIWGTL SIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINV
 TLAAMCSQVLCQEQGVCIRKNWNSSDYHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGK
 PTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPM
 ETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISVASL

B)

Representación de hidropatía de Kyle-Doolittle

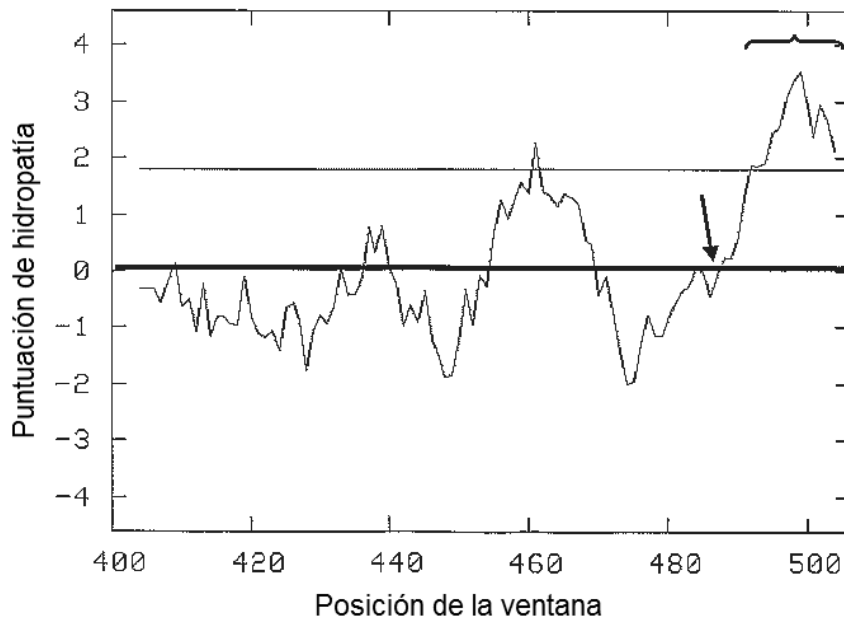


FIG. 3

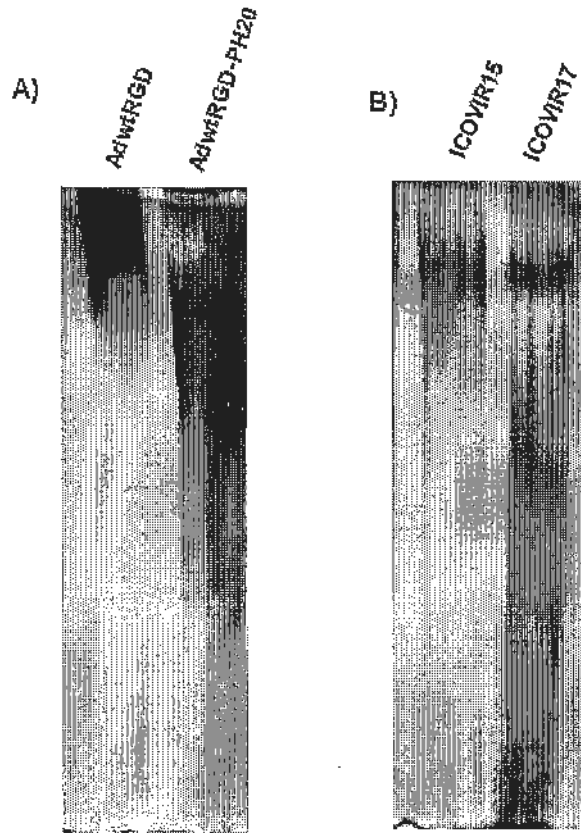
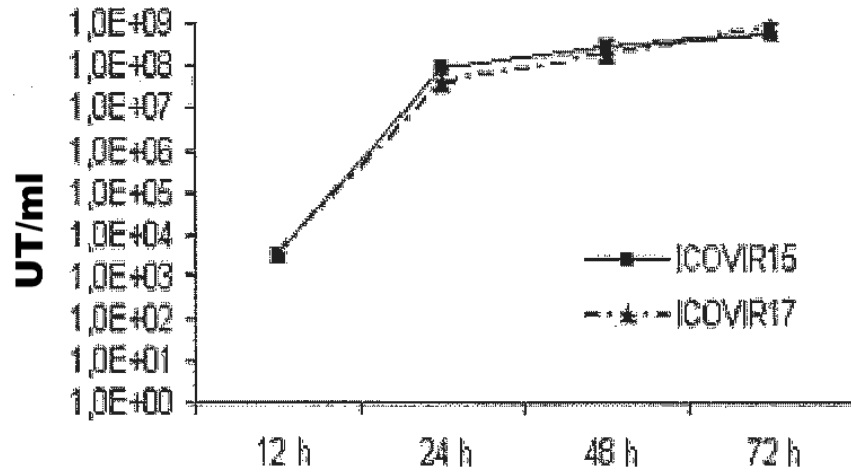


FIG. 4

A)



B)

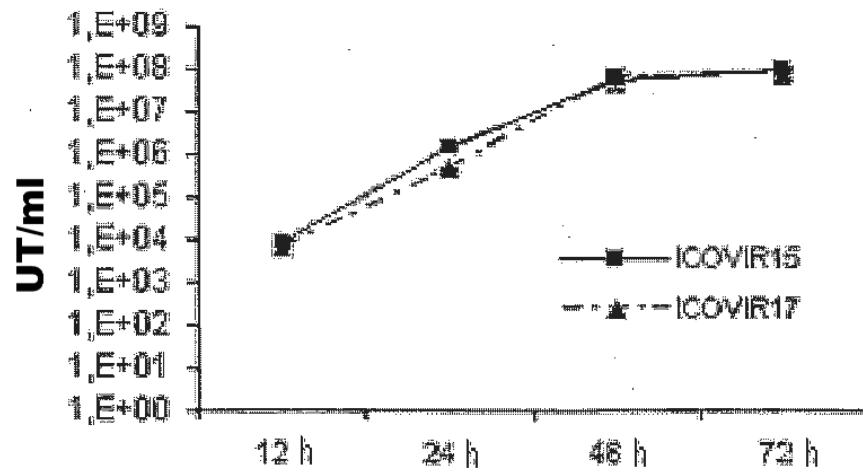
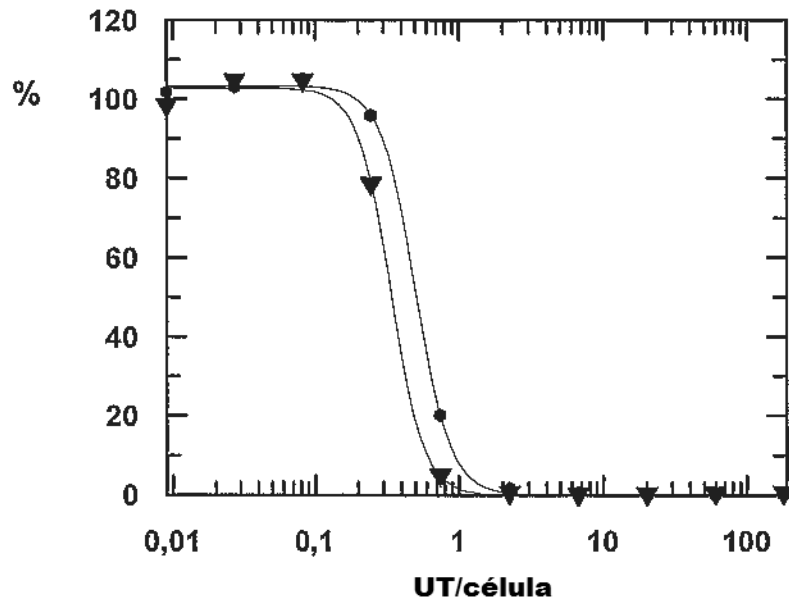


FIG. 5

A)

● ICOVIR15
▼ ICOVIR17



B)

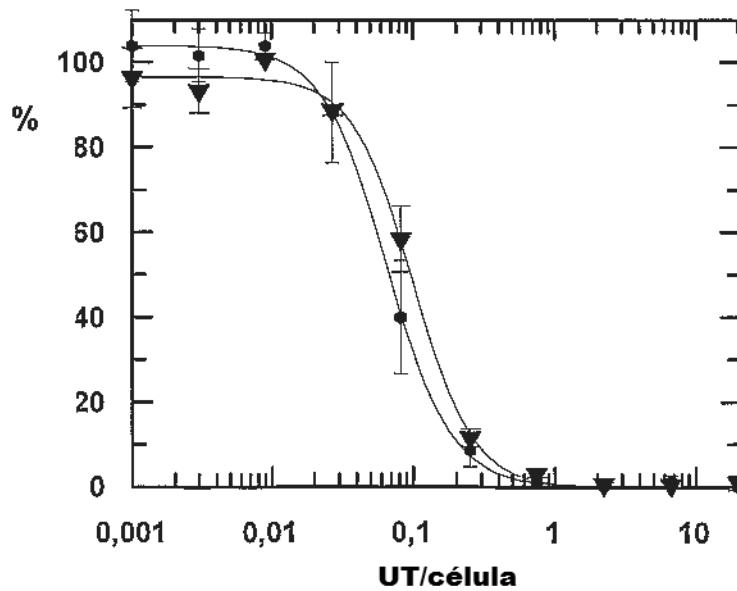
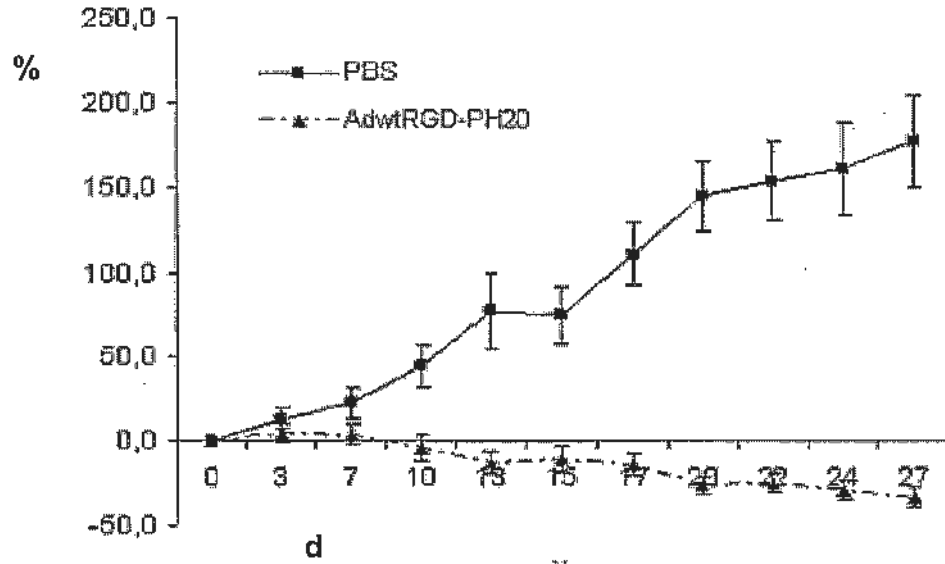


FIG. 6

A)



B)

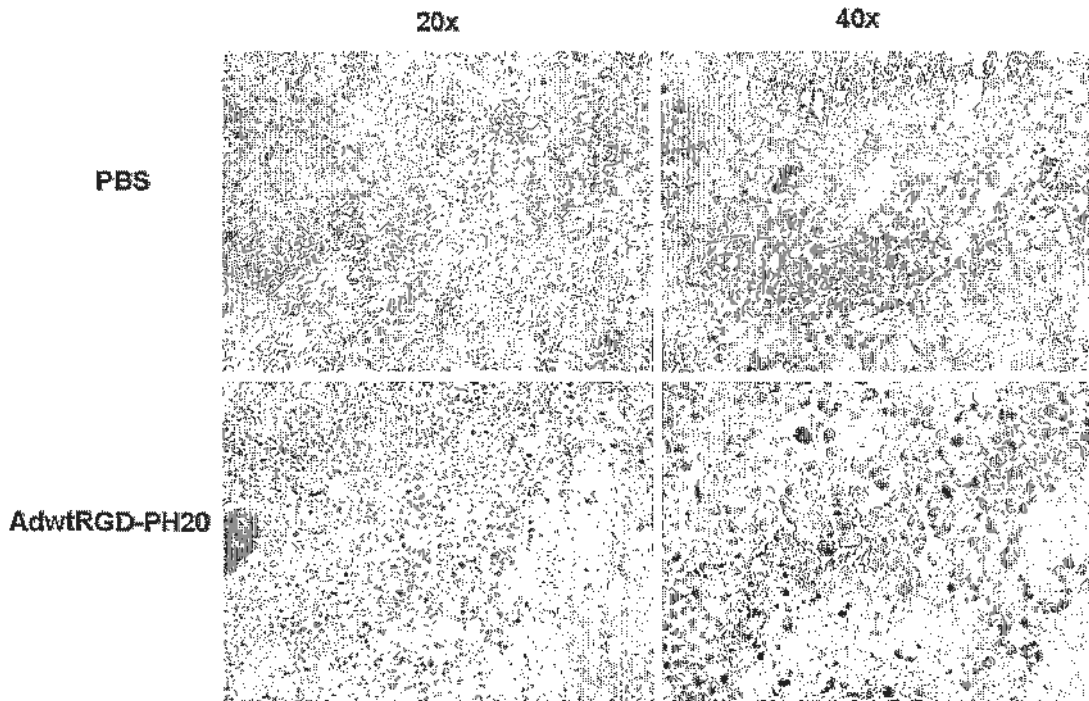
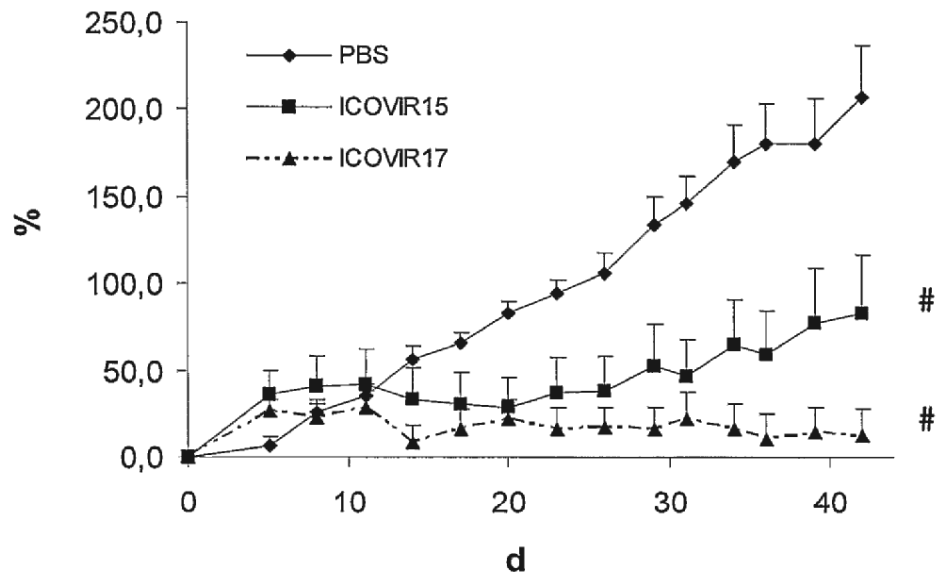


FIG. 7

A)

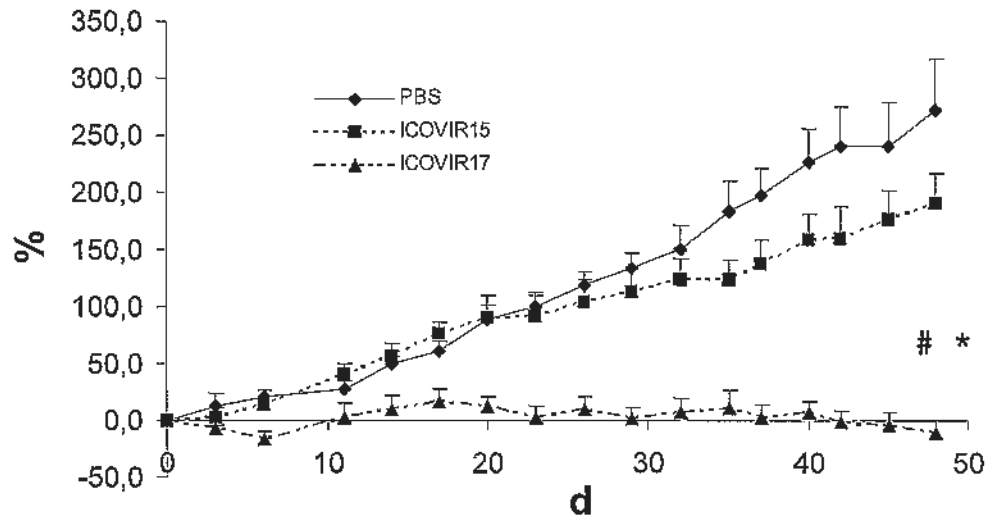


B)

	Volumen tumoral día 0	Volumen tumoral día 49	% de crecimiento tumoral día 49	Peso tumoral día 49	% de peso frente a PBS
PBS	123,86	394,3	207,17	0,552	100
ICOVIR15	129,2	221,6 #	82,8 #	0,342	61,95
ICOVIR17	128,4	137,6 #	12,2 #	0,199 * #	36,12

FIG. 8

A)



B)

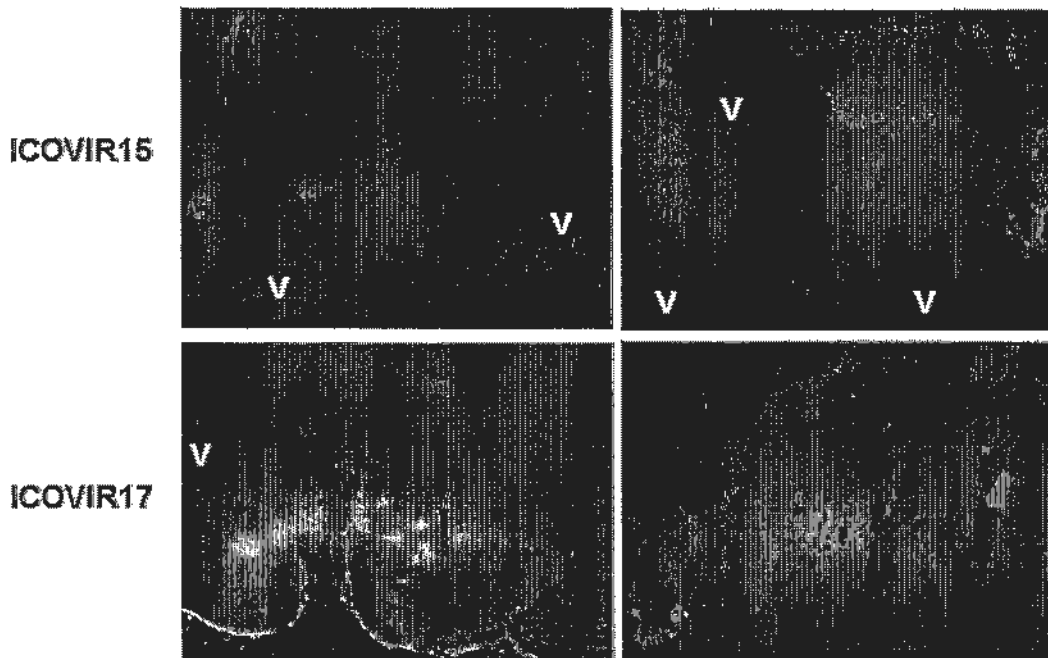
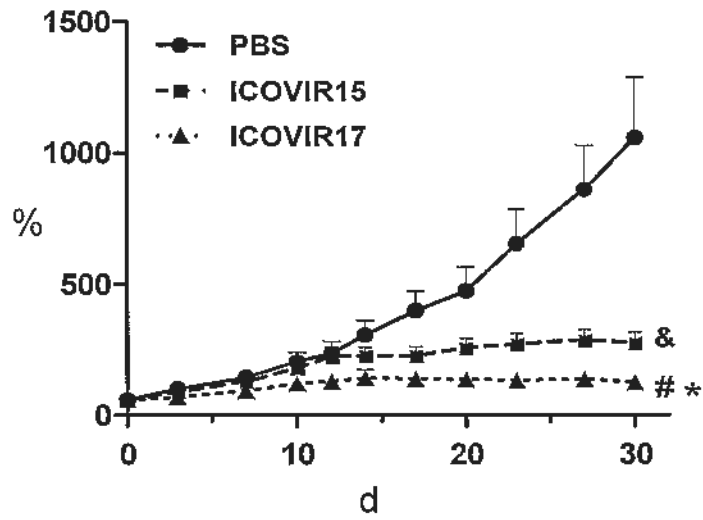


FIG. 9

A)



B)

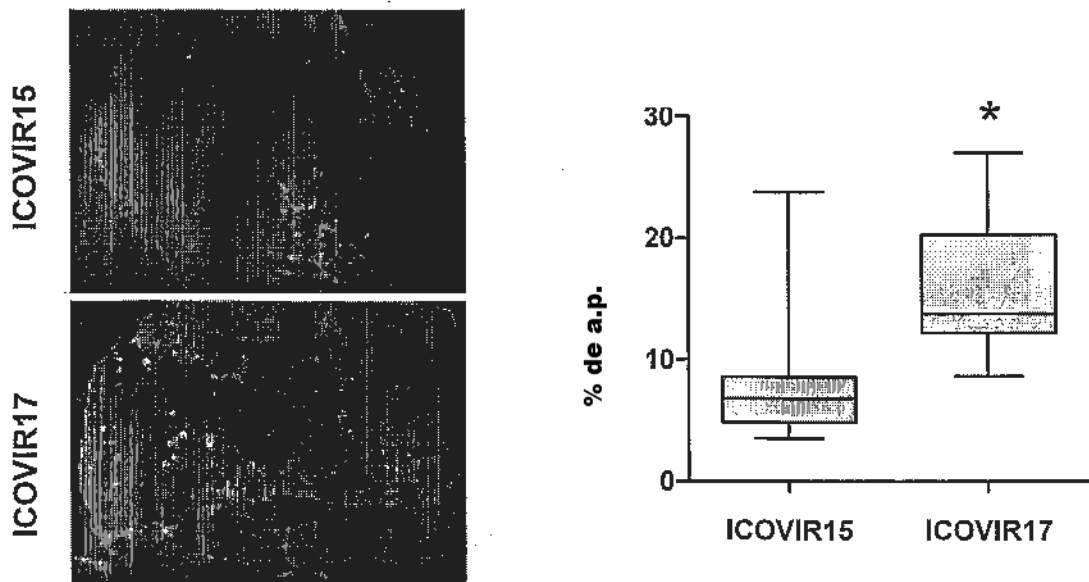
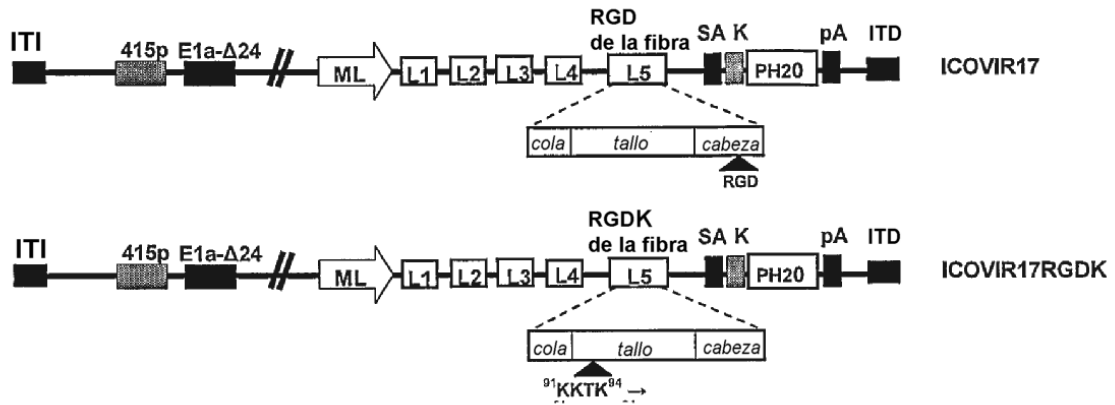


FIG. 10

A)

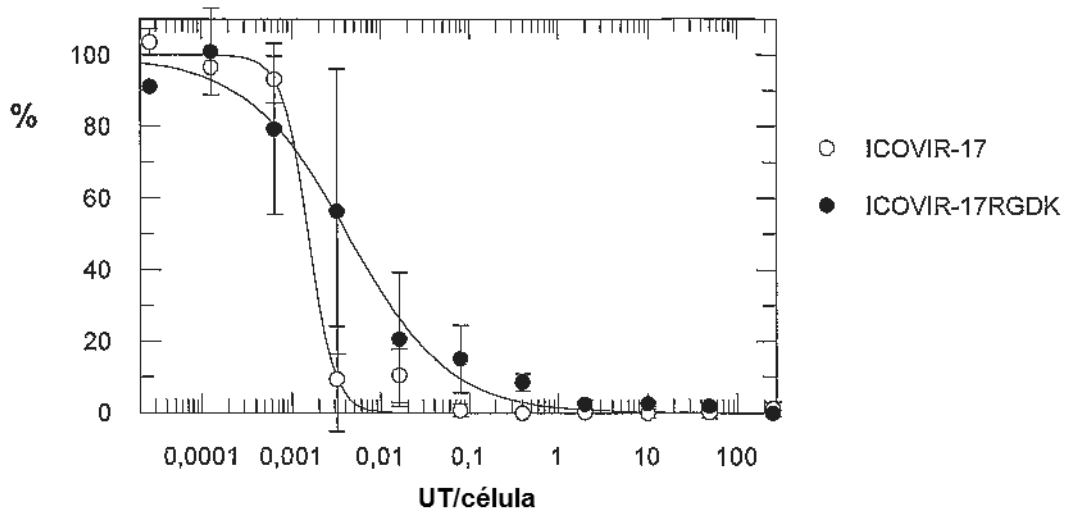


B)

¹MKRARPS EDTFN PVYPYDTETGPPTVPFLTPPFVSPNGFQES
 PPGVLSRLSEPLVTSNGMLALKMGNLSLDEAGNLT SQNVT
 TVSPPLRGDKSNINLEISAPLTVTSEALTVA AAAAPLMVAGNTLT
 MGSQAPLTVHDSKLSIATQGPLTVSEGKLALQTSGPLTTT DSS
 TLTITASPPLTTATGSLGIDLKEPIYTQNGKLG LKYGAPLHVTD
 D LNTLTVATGPGVTINNTSLGTVTGALGFDSQGNMQLNVAGG
 LRIDSQNRRLILDVSYPFDAQNQLNLR LGQGPLFINS AHNLDIN
 YNKGLYLFTASNNSKKLEVNLSTAKGLMFDATAIAINAGD GLEF
 GSPNAPNTNPLKTKIIGHGLEFDSNKAMVPKLG TGLSFDSTGAI
 TVGNKNNDKLT LWTPAPSPNCDLNAEKDAKLT LVLTKCGSQI
 LATVSVLAVKGLAPISGTVQSAHLIRFDENG VLLNNSFLDPEY
 WNFRNGDLTEGTAYTNAVGFMPNLSAYPKSHGKTAKSNIVSQ
 VYLNQDKTKPVTLTITLNGTQETGDTTPSAYSMSFSWDWSGH
 NYINEIFATSSYTF SYIAQE⁵⁸²

FIG. 11

A)



B)

