

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 132**

51 Int. Cl.:

A61K 35/761 (2015.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014 PCT/EP2014/072919**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15059303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014 E 14799117 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 3021859**

54 Título: **Adenovirus oncolíticos armados con genes heterólogos**

30 Prioridad:

25.10.2013 GB 201318880

25.10.2013 GB 201318885

23.12.2013 GB 201322851

23.01.2014 GB 201401159

10.04.2014 GB 201406470

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

27.03.2018

73 Titular/es:

**PSIOXUS THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
154B Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4SD, GB**

72 Inventor/es:

**CHAMPION, BRIAN ROBERT;
BROWN, ALICE CLAIRE NOEL;
FISHER, KERRY DAVID y
NICOLSON, TAMARA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 661 132 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 armados con genes heterólogos

Descripción

5 La presente descripción se refiere a un adenovirus modificado, por ejemplo, uno armado con al menos un transgén que incluye un transgén terapéutico y/o indicador, en particular, un virus del grupo B, tal como un adenovirus de serotipo 11 o un virus quimérico con la fibra, pentón y hexón de Ad11, una composición, tal como una formulación farmacéutica que comprende el virus, el uso de las formulaciones de virus y los virus, particularmente en el tratamiento, especialmente, en el tratamiento del cáncer. La descripción también se extiende a procedimientos para preparar el virus.

10 Antecedentes

Se han investigado vectores de adenovirus deficientes en replicación durante una cantidad de años para la administración de transgenes. En su mayoría, los genes se han insertado en la región E1 y/o en la región E3 porque estas regiones del genoma viral no son esenciales para los vectores.

15 Sorprendentemente, se ha realizado relativamente poco trabajo en ubicaciones alternativas para insertar transgenes en el genoma de adenovirus. Además, la mayor parte del trabajo se ha realizado en Ad5.

20 Actualmente, se encuentra en la clínica una nueva generación de adenovirus oncolíticos competentes en replicación. Estos virus no requieren líneas celulares complementarias para replicarse. E1 es una región esencial para la replicación viral y, aunque la región E3 en teoría se puede usar como una ubicación para insertar un transgén, sería útil poder insertar un transgén en más que esta ubicación. Sin embargo, se debe tener cuidado de no interrumpir el ciclo de vida del virus y/o sus propiedades virales ventajosas, tales como las propiedades terapéuticas del virus.

25 El enadenotucirev (EnAd) es un adenovirus oncolítico quimérico, anteriormente conocido como EnAd (documento WO2005/118825), con fibra, pentón y hexón de Ad11p, por lo tanto, es un virus del subgrupo B. Tiene una región E2B quimérica, que comprende ADN de Ad11p y Ad3. Casi toda la región E3 y parte de la región E4 se elimina en EnAd. Por lo tanto, tiene un espacio significativo en el genoma para acomodar material genético adicional sin dejar de ser viable. Además, debido a que EnAd es un adenovirus del subgrupo B, la inmunidad preexistente en humanos es menos común que, por ejemplo, Ad5. Otros ejemplos de virus oncolíticos quiméricos con fibra Ad11, pentón y hexón incluyen OvAd1 y OvAd2 (véase el documento WO2006/060314).

30 EnAd parece infectar preferencialmente a las células tumorales, se replica rápidamente en estas células y causa lisis celular. Esto, a su vez, puede generar respuestas inmunitarias inflamatorias estimulando así el cuerpo para que también combata el cáncer. Se cree que parte del éxito de EnAd está relacionado con la rápida replicación del virus in vivo.

35 Mientras que EnAd lisa selectivamente las células tumorales, puede ser posible introducir otras propiedades beneficiosas, por ejemplo, aumentar la actividad terapéutica del virus o reducir los efectos secundarios del virus armándolo con transgenes, tal como un transgén que codifique una proteína de señalización celular o un anticuerpo, o un transgén que codifique una entidad que estimule una(s) proteína(s) de señalización celular.

Armar de forma ventajosa un virus, con ADN que codifique ciertas proteínas que se puedan expresar dentro de la célula cancerosa, puede permitir que las propias defensas del cuerpo se empleen en combatir a las células tumorales de manera más efectiva, por ejemplo, haciendo que las células sean más visibles para el sistema inmune o suministrando un gen/proteína terapéutico, preferentemente, para atacar a las células tumorales.

40 Además, la capacidad de insertar transgenes que son indicadores en el genoma puede ayudar a los estudios clínicos o preclínicos.

45 Es importante que la expresión de los transgenes no afecte negativamente a la replicación u a otras propiedades ventajosas del virus. Por lo tanto, el gen o los genes deben insertarse en una ubicación que no comprometa la competencia de replicación y otras propiedades ventajosas del virus. Además, el genoma de los adenovirus está fuertemente empaquetado y, por lo tanto, puede ser difícil encontrar una ubicación adecuada para insertar transgenes. Esto también limita el tamaño de los transgenes que pueden acomodarse.

50 En productos terapéuticos es importante controlar con precisión las características del agente activo, de modo que esté bien caracterizado y pueda prepararse reproduciblemente. Los sistemas de la técnica anterior que usan transposones de inserción aleatoria no son muy adecuados para su uso en productos farmacéuticos porque el transgén se inserta aleatoriamente en el genoma del virus y el sitio de inserción puede estar influido por el transgén en sí mismo. También puede ser difícil reemplazar genes insertados por el transposón con genes alternativos.

Por lo tanto, es deseable desarrollar un medio robusto y repetible para generar adenovirus armados, que sea tolerante a una amplia variedad de transgenes.

Los presentes inventores han desarrollado un método para armar un adenovirus adecuado para acomodar una amplia variedad de transgenes bajo el control de un promotor endógeno o exógeno que da como resultado un virus viable, estable, recuperable que expresa el transgén en células tumorales. El método es robusto y repetible y puede ser estrictamente controlable.

- 5 El transgén se encuentra cerca del (adyacente al) gen que codifica la proteína de la fibra, ya sea en el extremo 5' y/o en el extremo 3' del gen, lo que no afecta negativamente a la estabilidad del virus.

Los presentes inventores han establecido que proteínas complicadas en forma de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y proteínas de señalización celular pueden insertarse en esta ubicación en el genoma de adenovirus, por ejemplo virus del grupo B, tales como Ad11 y virus derivados de Ad11, y ser expresados con éxito, por ejemplo, bajo el control del E4 endógeno o el promotor tardío principal, de modo que la proteína se exprese y la replicación del virus no se vea comprometida.

Un plásmido desarrollado por los presentes inventores proporciona nuevos sitios de restricción en el genoma de adenovirus que pueden utilizarse para la inserción de casetes transgénicos cerca del gen L5 (fibra) para proporcionar los virus de la presente descripción. Alternativamente, los plásmidos que contienen transgenes o casetes transgénicos en estas posiciones del sitio de inserción pueden sintetizarse directamente sin una etapa de clonación y, por lo tanto, sin necesidad de utilizar los sitios de restricción.

Sumario de la invención

La presente descripción proporciona un adenovirus oncolítico del grupo B competente que comprende un genoma que comprende la secuencia de fórmula (I):

20
$$5'ITR-B_1-B_A-B_2-B_X-B_B-B_Y-B_3-3'ITR \quad (I)$$

en la que:

B₁ es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

B_A es E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ es un enlace o comprende E3;

- 25 B_X es un enlace o una secuencia de ADN que comprende: un sitio de restricción, uno o más transgenes o ambos;

B_B comprende L5;

B_Y comprende un casete transgénico que comprende un transgen y una secuencia aceptora de división; y

B₃ es un enlace o comprende E4;

30 en el que el casete transgénico está bajo el control de un promotor endógeno seleccionado del grupo que consiste en E4 y promotor tardío principal y en el que el casete del transgen comprende un gen terapéutico que codifica un material seleccionado del grupo que consiste en una secuencia ARNi, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, quimiocinas, citoquinas, inmunomoduladores y enzimas.

En una realización, B_X comprende un sitio de restricción, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 sitios de restricción, tales como 1 ó 2. En una realización, B_X comprende al menos un transgén, por ejemplo 1 ó 2 transgenes. En una realización, B_X comprende al menos un transgen, por ejemplo 1 ó 2 transgenes y uno o más sitios de restricción, por ejemplo 2 ó 3 sitios de restricción, en particular cuando los sitios de restricción intercalan un gen o la secuencia de ADN que comprende los genes para permitirlo/que sean específicamente extirpados del genoma y/o reemplazados. Alternativamente, los sitios de restricción pueden intercalar cada gen, por ejemplo, cuando hay dos transgenes, se requieren tres sitios de restricción diferentes para asegurar que los genes puedan escindirse selectivamente y/o reemplazarse. En una realización, uno o más, por ejemplo, todos los transgenes están en forma de un casete transgénico. En una realización, B_X comprende SEQ ID NO: 10. En una realización, SEQ ID NO: 10 se interrumpe, por ejemplo, por un transgén. En la realización, la SEQ ID NO: 10 no se interrumpe. En una realización, B_X no comprende un sitio de restricción. En una realización, B_X es un enlace. En una realización, B_X comprende o consiste en uno o más transgenes.

45 En una realización, B_Y comprende un sitio de restricción, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 sitios de restricción, tales como 1 ó 2. En una realización, B_Y comprende al menos un transgen, por ejemplo 1 ó 2 transgenes. En una realización, B_Y comprende al menos un transgen, por ejemplo 1 ó 2 transgenes y uno o más sitios de restricción, por ejemplo 2 ó 3 sitios de restricción, en particular cuando los sitios de restricción intercalan un gen o la secuencia de ADN que comprende los genes para permitirlo/que sean específicamente extirpados del genoma y/o reemplazados. Alternativamente, los sitios de restricción pueden intercalar cada gen, por ejemplo, cuando hay dos transgenes, se requieren tres sitios de restricción diferentes para asegurar que los genes puedan escindirse selectivamente y/o reemplazarse. En una realización, uno o más, por ejemplo, todos los transgenes están en forma de un casete

transgénico. En una realización, B_Y comprende la SEQ ID NO: 11. En una realización, SEQ ID NO: 11 está interrumpida, por ejemplo, por un transgén. En la realización, la SEQ ID NO: 11 no se interrumpe. En una realización, B_Y no comprende un sitio de restricción. En una realización, B_Y comprende o consiste en uno o más transgenes.

5 En una realización, B_X y B_Y comprenden cada uno un sitio de restricción, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 sitios de restricción, tales como 1 ó 2. En una realización, B_X y B_Y comprenden cada uno al menos un transgen, por ejemplo 1 ó 2 transgenes. En una realización, B_X y B_Y comprenden cada uno al menos un transgen, por ejemplo 1 ó 2 transgenes y uno o más sitios de restricción, por ejemplo 2 ó 3 sitios de restricción, en particular cuando los sitios de restricción intercalan un gen o la secuencia de ADN que comprende los genes para permitir que sea específicamente extirpado del genoma y/o reemplazado. Alternativamente, los sitios de restricción pueden intercalar cada gen, por ejemplo, cuando hay dos transgenes, se requieren tres sitios de restricción diferentes para asegurar que los genes puedan escindir selectivamente y/o reemplazarse. En una realización, uno o más, por ejemplo, todos los transgenes están en forma de un casete transgénico. En una realización, B_X y B_Y comprenden SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 respectivamente. En una realización, B_X y B_Y no comprenden un sitio de restricción. En una realización, B_X es un enlace y B_Y no es un enlace.

En una realización, el transgén se localiza en B_X. En una realización, el transgén o casete transgénico se localiza en B_Y. En una realización, un casete transgénico o transgén se encuentra en B_X y B_Y, por ejemplo, los transgenes pueden ser iguales o diferentes en cada ubicación.

20 Ventajosamente, el transgén en las construcciones de virus presentes se inserta en una ubicación que se elimina de los genes tempranos porque esto reduce la probabilidad de afectar la expresión del gen del virus o la velocidad de replicación.

En una realización, se proporciona un adenovirus oncolítico competente de replicación del serotipo 11 o su derivado del virus en el que la fibra, hexón y cápside son del serotipo 11, en donde el genoma del virus comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a anticuerpo, dicha secuencia de ADN está bajo el control de un promotor endógeno al adenovirus seleccionado que consiste en E4 y el promotor principal tardío, de modo que el transgén no interfiera con la replicación del virus, por ejemplo, en donde la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al anticuerpo está bajo el control del promotor E4 o alternativamente bajo el control del promotor principal tardío, en particular en donde la secuencia de ADN que codifica un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo se localiza después de L5 en la secuencia del genoma vírico (es decir, hacia el extremo 3' de la secuencia del virus). Ventajosamente, usar un promotor endógeno maximiza la cantidad de espacio disponible para insertar transgenes.

30 Ventajosamente, cuando está bajo el control de estos promotores, el virus sigue siendo competente para la replicación y también es capaz de expresar el anticuerpo como un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión adecuado u otra proteína. Por lo tanto, el anticuerpo u otra proteína de elección serán expresados por la célula cancerosa. El empleo de un promotor endógeno puede ser ventajoso porque reduce el tamaño del casete transgénico que debe incorporarse para expresar el anticuerpo, fragmento u otra proteína, es decir, el casete puede ser más pequeño porque no se necesita incluir un promotor exógeno.

40 El empleo de un promotor endógeno en el virus también puede ser ventajoso en un contexto terapéutico porque el transgén solo se expresa cuando el virus se replica en oposición a un promotor exógeno constitutivo que transcribe continuamente el transgén y puede conducir a una concentración inapropiada del anticuerpo o fragmento.

En una realización, la expresión del anticuerpo o fragmento está bajo el control del promotor principal tardío.

En una realización, la expresión del anticuerpo o fragmento está bajo el control del promotor E4.

45 En un aspecto, se proporciona un adenovirus oncolítico competente de replicación del serotipo 11 o un derivado del virus del mismo, en donde la fibra, el hexón y la cápside son del serotipo 11, en donde el genoma del virus comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de anticuerpo localizado en una parte del genoma del virus que se expresa tardíamente en el ciclo de replicación del virus y tal que el transgén no interfiere con la replicación del virus, en donde dicha secuencia de ADN está bajo el control de un promotor exógeno al adenovirus, por ejemplo, en donde la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión al anticuerpo está bajo el control del promotor CMV, en particular, la secuencia de ADN que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo se localiza después de L5 en la secuencia del genoma del virus (es decir, hacia el extremo del extremo 3' de la secuencia del virus). El empleo de un promotor exógeno puede ser ventajoso porque puede expresar fuerte y constitutivamente el anticuerpo o fragmento, que puede ser particularmente útil en algunas situaciones, por ejemplo, cuando el paciente tenga un cáncer muy generalizado. En una realización, la expresión del anticuerpo o fragmento está bajo el control de un promotor de CMV. En una realización, el promotor exógeno está asociado con esta secuencia de ADN, por ejemplo, es parte del casete de expresión que codifica el anticuerpo o fragmento.

En una realización, la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo o fragmento se localiza después del gen L5 en la secuencia del virus. Ventajosamente, los presentes inventores han establecido que se pueden insertar una variedad

de transgenes en B_x y/o B_y bajo el control de un promotor exógeno o endógeno, sin afectar adversamente el ciclo de vida del virus o la estabilidad del vector.

5 En una realización, el transgén es parte de un casete transgénico que comprende al menos una secuencia codificante (es decir, al menos un transgén) y opcionalmente uno o más elementos seleccionados independientemente entre:

i. un regulador de la expresión génica, tal como un promotor exógeno o aceptor de empalme;

ii. una secuencia de ADN de entrada de ribosoma interno (IRES);

iii. una secuencia de ADN que codifica un péptido 2A de alta eficacia de autoescisión;

iv. una secuencia de ADN que codifica una secuencia de poliadenilación, y

10 v. combinaciones de los mismos.

Por lo tanto, en una realización, el casete transgénico comprende i) o ii) o iii) o iv).

En una realización, el casete transgénico comprende i) y ii), o i) y iii), o i) y iv), o ii) y iii), o ii) y iv), o iii) y iv).

En una realización, el casete transgénico comprende i) y ii) y iii), o i) y ii) y iv), o i) y iii) y iv), o ii) y iii) y iv).

En una realización, el casete transgénico comprende i) y ii) y iii) y iv).

15 En una realización, el transgen o casete transgénico comprende una secuencia de Kozak, que ayuda en la traducción de ARNm, por ejemplo, al comienzo de una secuencia de codificación de proteína.

También se proporciona una composición que comprende un virus de acuerdo con la presente descripción, en particular una composición farmacéutica, que comprende, por ejemplo, un adenovirus según la descripción y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 La presente descripción se refiere además a un adenovirus o composición de acuerdo con la descripción para su uso en tratamientos, por ejemplo, para su uso en el tratamiento del cáncer.

La descripción también se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus, como se describe en la presente memoria, o una composición que comprende la misma, a un paciente que lo necesita, en particular, un paciente humano.

25 Descripción detallada

El transgén, como se emplea en este documento, se refiere a un gen que se ha insertado en la secuencia del genoma, que es un gen que no es natural para el virus (exógeno) o que normalmente no se encuentra en esa ubicación particular en el virus. Se dan a continuación ejemplos de transgenes. Un transgén, como se emplea en este documento, también incluye un fragmento funcional del gen que es una porción del gen que, cuando se inserta, es adecuado para realizar la función o la mayor parte de la función del gen de longitud completa.

30 El transgén y la secuencia codificante se usan de forma intercambiable en el presente documento en el contexto de insertos en el genoma viral, a menos que el contexto indique lo contrario. La secuencia de codificación, como se emplea en la presente memoria, significa, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional. Típicamente, la secuencia codificante es ADNc para el transgén que codifica el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína de interés. El ARN funcional, péptidos, polipéptido y proteínas de interés se describen a continuación.

35 Claramente, el genoma del virus contiene secuencias codificantes de ADN. Los genes endógenos (de origen natural) en la secuencia genómica del virus no se consideran transgénicos, en el contexto de la presente memoria descriptiva, a menos que hayan sido modificados por técnicas recombinantes, tales como las que se encuentran en un lugar no natural o en un entorno no natural.

40 En una realización, el transgén como se emplea en la presente memoria se refiere a un segmento de ADN que contiene un gen o secuencia de ADNc que se ha aislado de un organismo y se introduce en un organismo diferente, es decir, el virus de la presente descripción. En una realización, este segmento no nativo de ADN puede retener la capacidad de producir ARN, péptidos, polipéptidos o proteínas funcionales.

45 Por lo tanto, en una realización, el transgén insertado codifica una proteína, polipéptido o péptido humano o humanizado.

En una realización, el transgén insertado codifica una proteína, polipéptido o péptido no humano (tal como una proteína, polipéptido o péptido de mamífero no humano) o una molécula de ARN, por ejemplo de un ratón, rata, conejo, camello, llama o similar. Ventajosamente, los virus de la presente descripción permiten que los transgenes

se transporten dentro de la célula cancerosa. Por lo tanto, las respuestas generadas por el paciente humano a una secuencia no humana (tal como una proteína) se pueden minimizar mediante este suministro intracelular.

Una secuencia de ADN puede comprender más de un transgén, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 transgenes, tal como 1 ó 2.

Un casete transgénico puede comprender más de un transgén, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 transgenes, tal como 1 ó 2.

5 En una o más realizaciones, el casete está dispuesto como se muestra en una o más de las Figuras o los ejemplos.

El casete transgénico, como se emplea en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN que codifica uno o más transgenes en forma de una o más secuencias de codificación y uno o más elementos reguladores.

Un casete transgénico puede codificar una o más secuencias de ARNm monocistrónicas y/o policistrónicas.

10 En una realización, el transgen o casete transgénico codifica un ARNm monocistrónico o policistrónico y, por ejemplo, el casete es adecuado para la inserción en el genoma del adenovirus en un lugar bajo el control de un promotor endógeno o promotor exógeno o una combinación de los mismos.

El ARNm monocistrónico, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una molécula de ARNm que codifica un único ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína.

En una realización, el casete transgénico codifica el ARNm monocistrónico.

15 En una realización, el casete transgénico, en el contexto de un casete que codifica ARNm monocistrónico, significa un segmento de ADN que contiene opcionalmente un promotor exógeno (que es una secuencia reguladora que determinará dónde y cuándo el transgén está activo) o un sitio de empalme (que es una secuencia reguladora que determina cuándo una molécula de ARNm será escindida por el complejo de corte y empalme) una secuencia codificante (es decir, el transgén), habitualmente derivada del ADNc para la proteína de interés, que contiene
20 opcionalmente una secuencia señal poliA y una secuencia terminadora.

En una realización, el casete transgénico puede codificar una o más secuencias de ARNm policistrónicas.

El ARNm policistrónico como se emplea en la presente memoria se refiere a una molécula de ARNm que codifica dos o más ARN, péptidos o proteínas funcionales o una combinación de los mismos. En una realización, el casete transgénico codifica un ARNm policistrónico.

25 En una realización, el casete transgénico en el contexto de un casete que codifica el ARNm policistrónico incluye un segmento de ADN que contiene opcionalmente un promotor exógeno (que es una secuencia reguladora que determinará dónde y cuándo el transgén está activo) o un sitio de corte y empalme (que es una secuencia reguladora que determina cuando una molécula de ARNm será escindida por el complejo de corte y empalme) dos o
30 más secuencias codificantes (es decir, los transgenes), normalmente derivadas del ADNc para la proteína o péptido de interés, por ejemplo, en donde cada secuencia codificante está separada por un IRES o un péptido 2A. Después de la última secuencia de codificación a transcribir, el casete puede contener opcionalmente una secuencia de poliA y una secuencia de terminación.

En una realización, el casete del transgén codifica un mRNA monocistrónico seguido de un mRNA policistrónico. En otra realización, el casete transgénico codifica un ARNm policistrónico seguido de un ARNm monocistrónico.

35 La presente descripción se refiere a un adenovirus del grupo B. El adenovirus del grupo B es un adenovirus humano. El adenovirus de acuerdo con la presente descripción se extiende adicionalmente a cualesquiera serotipos adenovirales, hasta ahora, no identificados o no clasificados.

40 Hay más de 50 serotipos adenovirales actualmente conocidos, que se clasifican en los subgrupos A-F. Véase, por ejemplo, Strauss, "Adenovirus infections in humans," en The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984) y Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," en Fields Virology, Vol.2, Cuarta Edición, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2265-2267 (2001), como se muestra en la Tabla 1.

SubGrupo	Serotipo adenoviral
A	12,18,31
B	3,7,11,14,16,21,34,35,51
C	1,2,5,6
D	8-10,13,15,17,19,20,22-30,32,33,36-39,42-49,50
E	4
F	40,41

5 El adenovirus de la presente descripción es un subgrupo B, por ejemplo, seleccionado independientemente del grupo que comprende o consiste en: Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34 y Ad51, tales como Ad11, en particular Ad11p (la cepa de Slobitski). En una realización, el adenovirus de la invención tiene la cápside, tal como el hexón y/o la fibra de un adenovirus del subgrupo B, tal como Ad11, en particular Ad11p. En una realización, el adenovirus es Ad11 o tiene la fibra y/o hexón y/o pentón de Ad11, tal como Ad11p.

En una realización, no es un virus del grupo A.

10 En una realización, el adenovirus no es un virus del grupo C. En una realización, el adenovirus no es Ad5. Ad5, como se emplea en la presente memoria, se refiere a adenovirus conocidos designados como serotipo 5, no se extiende a virus genéticamente modificados que comprenden secuencias de Ad5. En una realización, los virus de la presente descripción no tienen una cápside de Ad5.

15 En una realización, el adenovirus de la presente descripción es quimérico. Cuando un adenovirus es quimérico, se utilizarán las características de la cápside externa para determinar el serotipo. Quimérico, como se emplea en el presente documento, se refiere a un virus que comprende ADN de al menos dos serotipos de virus diferentes, que incluyen diferentes serotipos dentro del mismo grupo.

En una realización, el virus oncolítico tiene una fibra, proteínas hexónicas y pentónicas del mismo serotipo, por ejemplo Ad11, en particular Ad11p, por ejemplo, se encuentra en las posiciones 30812-31789, 18254-21100 y 13682-15367 de la secuencia genómica de esta última, en donde las posiciones de los nucleótidos son relativas al genbank ID 217307399 (número de entrada: GC689208).

20 En una realización, el adenovirus es enadenotucirev (también conocido como EnAd y anteriormente como EnAd). Enadenotucirev, como se emplea en este documento, se refiere al adenovirus quimérico de SEQ ID NO: 12. Es un adenovirus quimérico oncolítico competente en replicación que tiene propiedades terapéuticas potenciadas en comparación con los adenovirus de tipo salvaje (véase el documento WO2005/118825). EnAd tiene una región E2B quimérica, que presenta ADN de Ad11p y Ad3, y eliminaciones en E3/E4. Los cambios estructurales en
25 enadenotucirev resultan en un genoma que es aproximadamente 3,5kb más pequeño que Ad11p, proporcionando así un "espacio" adicional para la inserción de transgenes.

OvAd1 y OvAd2 también son adenovirus quiméricos similares a enadenotucirev, que también tienen un "espacio" adicional en el genoma (véase el documento WO2008/080003). Por lo tanto, en una realización, el adenovirus es OvAd1 u OvAd2.

30 En una realización, el adenovirus es oncolítico. El adenovirus oncolítico, como se emplea en la presente memoria, significa un adenovirus que mata preferencialmente las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas.

En una realización, el virus oncolítico es apoptótico. Es decir, acelera la muerte celular programada.

35 En una realización, el virus oncolítico es citolítico. La actividad citolítica de los adenovirus oncolíticos de la descripción se puede determinar en líneas celulares tumorales representativas y los datos se pueden convertir en una medición de la potencia, por ejemplo, con un adenovirus perteneciente al subgrupo C, tal como Ad5, que se usa como estándar (es decir, dada una potencia de 1). Un método adecuado para determinar la actividad citolítica es un ensayo MTS (véase el Ejemplo 4, Figura 2 del documento WO2005/118825).

40 En una realización, el virus oncolítico es necrolítico. Es decir, causa o acelera la necrosis celular o la muerte celular inmunogénica. En una realización, la muerte celular necrolítica es ventajosa porque desencadena e induce las respuestas inmunitarias de los pacientes (huésped).

45 La replicación competente en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a un virus que posee toda la maquinaria necesaria para replicarse en células in vitro e in vivo, es decir, sin la ayuda de una línea celular de empaquetamiento. Un vector viral, por ejemplo, eliminado en la región E1, capaz de replicarse en una línea celular de empaquetamiento complementario no es un virus competente en replicación en el presente contexto.

Los vectores virales son deficientes en replicación y requieren una célula de empaquetamiento para proporcionar un gen complementario que permita la replicación.

El genoma de adenovirus como se emplea en este documento significa la secuencia de ADN que codifica las proteínas estructurales y los elementos relevantes para la función/ciclo de vida de un adenovirus.

50 Todos los genomas de adenovirus humanos examinados hasta la fecha tienen la misma organización general, es decir, los genes que codifican funciones específicas están ubicados en la misma posición en el genoma viral (denominados en este documento elementos estructurales). Cada extremo del genoma viral tiene una secuencia corta conocida como la repetición terminal invertida (ITR), que se requiere para la replicación viral. El genoma viral contiene cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), tres unidades tempranas tardías (IX,

IVa2 y E2 tardía) y una unidad tardía (tardía principal) que se procesa para generar cinco familias de ARNm tardíos (L1-L5). Las proteínas codificadas por los genes tempranos están principalmente involucradas en la replicación y la modulación de la respuesta de la célula huésped frente a la infección, mientras que los genes tardíos codifican las proteínas estructurales virales. Los genes tempranos están precedidos por la letra E y los genes tardíos están precedidos por la letra L.

El genoma de los adenovirus está muy empaquetado, es decir, hay una pequeña secuencia no codificante y, por lo tanto, puede ser difícil encontrar una ubicación adecuada para insertar transgenes. Los presentes inventores han identificado dos regiones de ADN en las que se toleran transgenes, en particular los sitios identificados son adecuados para acomodar transgenes complicados, tales como los que codifican anticuerpos. Es decir, el transgén se expresa sin afectar adversamente la viabilidad del virus, propiedades naturales tales como las propiedades oncolíticas o la replicación.

En una realización, el virus oncolítico, u oncolítico parcial, según la descripción puede ser el resultado de la delección en la región E4 y/o E3, por ejemplo, estar delecionado en parte de la región E4 o estar completamente eliminado en la región E3 o estar, alternativamente, eliminado en parte de la región E4 (tal como E4orf4) y totalmente eliminado en la región E3, por ejemplo, como se ejemplifica en las secuencias descritas en este documento.

En una realización, el virus oncolítico de la descripción es quimérico. Quimérico, como se emplea en el presente documento, se refiere a un virus que comprende ADN de dos o más serotipos diferentes y tiene propiedades de virus oncolítico.

En una realización, el virus oncolítico es EnAd o un derivado activo del mismo que conserva las propiedades beneficiosas esenciales del virus. EnAd se describe en el documento WO2005/118825 y la secuencia completa para el virus se proporciona en la presente SEQ ID NO: 12. La región E2B quimérica se describe en el presente documento como SEQ ID NO: 47.

Los virus oncolíticos alternativos incluyen OvAd1 y OvAd2, que se describen respectivamente como SEQ ID NO: 2 y 3 en el documento WO2008/080003.

Ventajosamente, los adenovirus de la presente descripción exhiben perfiles de actividad tipo virus, por ejemplo, replicación y/o infectividad, frente a EnAd después de la infección de una variedad de diferentes líneas celulares de cáncer de colon in vitro.

Elementos estructurales de los adenovirus

La presente descripción también se refiere a nuevas secuencias de virus o componentes/constructos virales, tales como los plásmidos, descritos en este documento.

En una realización, se proporciona un compuesto de fórmula (I), en donde B_x y B_y no son un enlace y comprende un transgén, un sitio de restricción o ambos, tal como B_x y B_y son ambos un transgén.

Un enlace se refiere a un enlace covalente que conecta una secuencia de ADN con otra secuencia de ADN, por ejemplo conectando una sección del genoma del virus con otra. Por lo tanto, cuando una variable en la fórmula (I) en este documento representa un enlace, la característica o elemento representado por el enlace está ausente, es decir, eliminado.

Como la estructura de los adenovirus es, en general, similar, los elementos siguientes se discuten en términos de los elementos estructurales y la nomenclatura comúnmente utilizada que se refiere a los mismos, que son conocidos por los expertos. Cuando se hace referencia a un elemento en este documento, nos referimos a la secuencia de ADN que codifica el elemento o a una secuencia de ADN que codifica la misma proteína estructural del elemento en un adenovirus. Esto último es relevante debido a la redundancia del código de ADN. La preferencia de los virus por el uso de codones debe ser considerada para obtener resultados optimizados.

Cualquier elemento estructural de un adenovirus empleado en los virus de la presente descripción puede comprender o consistir en la secuencia natural o puede tener similitud en la longitud dada de al menos 95%, tal como 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. La secuencia original puede modificarse para omitir 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% del material genético. La persona experta es consciente de que cuando se realizan cambios, los marcos de lectura del virus no se deben alterar de modo que la expresión de las proteínas estructurales se interrumpa.

En una realización, el elemento dado es una secuencia de longitud completa, es decir, el gen de longitud completa.

En una realización, el elemento dado es menor que una longitud total y conserva la misma función o la correspondiente a la secuencia de longitud completa.

En una realización, para un elemento dado que es opcional en las construcciones de la presente descripción, la secuencia de ADN puede ser menor que una longitud completa y no tener funcionalidad.

- Los genes estructurales que codifican proteínas estructurales o funcionales del adenovirus generalmente están unidos por regiones de ADN no codificantes. Por lo tanto, existe cierta flexibilidad sobre dónde "cortar" la secuencia genómica del elemento estructural de interés (especialmente las regiones no codificantes de la misma) con el fin de insertar un transgén en los virus de la presente descripción. Por lo tanto, a los efectos de la presente memoria descriptiva, el elemento se considerará un elemento estructural de referencia en la medida en que sea adecuado para el propósito y no codifique material extraño. Por lo tanto, si es apropiado, el gen se asociará con regiones no codificantes adecuadas, por ejemplo, tal como se encuentra en la estructura natural del virus.
- Por lo tanto, en una realización, un inserto, tal como ADN que codifica un sitio de restricción y/o transgén, se inserta en una región no codificante de ADN del virus genómico, tal como un intrón o secuencia intergénica. Habiendo dicho esto, algunas regiones no codificantes de adenovirus pueden tener una función, por ejemplo en el corte y empalme alternativo, la regulación de la transcripción o la regulación de la traducción, y esto puede necesitar ser tomado en consideración.
- Los sitios identificados en este documento, que están asociados con la región L5, son adecuados para acomodar una variedad de secuencias de ADN que codifican entidades complejas tales como ARNi, citocinas, proteínas monocatenarias o multiméricas, tales como anticuerpos.
- Un gen, como se emplea en la presente memoria, se refiere a secuencias codificantes y a cualquiera no codificante asociada con la misma, por ejemplo intrones y exones asociados. En una realización, un gen comprende o consiste únicamente en componentes estructurales esenciales, por ejemplo, la región codificante.
- A continuación sigue una discusión relacionada con elementos estructurales específicos de adenovirus.
- Las secuencias de repetición de terminal invertida (ITR) son comunes a todos los adenovirus conocidos y se denominaron así por su simetría, y son los orígenes de replicación del cromosoma vírico. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad de formar una horquilla.
- El 5'ITR, como se emplea en este documento, se refiere a parte o la totalidad de un ITR del extremo 5' de un adenovirus, que retiene la función del ITR cuando se incorpora a un adenovirus en una ubicación apropiada. En una realización, el 5'ITR comprende o consiste en la secuencia de aproximadamente 1 bp a 138 pb de SEQ ID NO: 12 o una secuencia 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud, en particular, la secuencia que consta de aproximadamente 1 bp a 138 pb de SEQ ID NO: 12.
- El 3'ITR, como se emplea en la presente memoria, se refiere a parte o la totalidad de un ITR del extremo 3' de un adenovirus que retiene la función del ITR cuando se incorpora a un adenovirus en una ubicación apropiada. En una realización, el 3'ITR comprende o consiste en la secuencia de aproximadamente 32189 bp a 32326 bp de SEQ ID NO: 12 o una secuencia 90, 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a la misma a lo largo de toda la longitud, en particular la secuencia que consiste en desde aproximadamente 32189 pb a 32326 pb de SEQ ID NO: 12.
- B₁, como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica: parte o la totalidad de un E1A de un adenovirus, parte o la totalidad de la región E1B de un adenovirus, y parte o toda la región E1A y E1B de un adenovirus independientemente.
- E1A, como se emplea en la presente memoria, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o la totalidad de una región de E1A de adenovirus. El último en este documento se refiere a E1A polipéptido/proteína. Puede estar mutado de modo que la proteína codificada por el gen E1A tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de modo que tenga: la misma función que el tipo salvaje (es decir, la proteína correspondiente no mutada); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo salvaje; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo salvaje; o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo salvaje o una combinación de la misma según corresponda.
- E1B, como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o toda la región E1B de adenovirus (es decir, polipéptido o proteína), puede mutarse de manera que la proteína codificada por el gen/región E1B tenga cambios de aminoácidos conservativos o no conservativos. tal que tenga: la misma función que el tipo salvaje (es decir, la proteína correspondiente no mutada); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo salvaje; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo salvaje; o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo salvaje o una combinación de la misma según corresponda.
- Por lo tanto, B₁ puede modificarse o no modificarse en relación con una región E1 de tipo salvaje, como un E1A y/o E1B de tipo salvaje. El experto puede identificar fácilmente si E1A y/o E1B están presentes o (parcialmente) eliminados o mutados.
- El tipo silvestre, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un adenovirus conocido. Un adenovirus conocido es aquel que ha sido identificado y nombrado, independientemente de si la secuencia está disponible.
- En una realización, B₁ tiene la secuencia de 139 pb a 3932 pb de SEQ ID NO: 12.

- 5 B_A , como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica las regiones E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 que incluye cualquier secuencia no codificante, según sea apropiado. En general, esta secuencia no comprenderá un transgén. En una realización, la secuencia es sustancialmente similar o idéntica a una secuencia contigua de un adenovirus conocido, por ejemplo un serotipo mostrado en la Tabla 1, en particular un virus del grupo B, por ejemplo Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 o una combinación de los mismos, tal como Ad3, Ad11 o una combinación de los mismos. En una realización, E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 se refiere a que comprende estos elementos y otros elementos estructurales asociados con la región, por ejemplo B_A generalmente incluirá la secuencia que codifica la proteína IV2a, por ejemplo como sigue: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4
- 10 En una realización, la región E2B es quimérica. Es decir, comprende secuencias de ADN de dos o más serotipos adenovirales diferentes, por ejemplo de Ad3 y Ad11, tales como Ad11p. En una realización, la región E2B tiene la secuencia de 5068 pb a 10355 pb de SEQ ID NO: 12 o una secuencia 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la misma en toda la longitud.
- En una realización, el E2B en el componente B_A comprende las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 47 (que corresponde a SEQ ID NO: 3 descrito en el documento WO2005/118825).
- 15 En una realización, B_A tiene la secuencia de 3933 pb a 27184 pb de SEQ ID NO: 12.
- E3, como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o toda la región E3 de un adenovirus (es decir, proteína/polipéptido), puede mutarse de manera que la proteína codificada por el gen E3 tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, tales que tiene la misma función que el tipo salvaje (la proteína no mutada correspondiente); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo salvaje; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo salvaje o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma, según corresponda.
- 20 En una realización, la región E3 es un serotipo del adenovirus dado en la Tabla 1 o una combinación de los mismos, en particular un serotipo del grupo B, por ejemplo Ad3, Ad7, Ad11 (en particular Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 o una combinación de los mismos, tal como Ad3, Ad11 (en particular Ad11p) o una combinación de los mismos.
- 25 En una realización, la región E3 está parcialmente delecionada, por ejemplo, está delecionada un 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%. En una realización, B_2 es un enlace, en el que el ADN que codifica la región E3 está ausente.
- 30 En una realización, el ADN que codifica la región E3 puede reemplazarse o interrumpirse por un transgén. Como se emplea en este documento, la "región E3", reemplazada por un transgén, como se emplea en este documento, incluye parte o la totalidad de la región E3 y se reemplaza con un transgén.
- En una realización, la región B_2 comprende la secuencia de 27185 pb a 28165 pb de SEQ ID NO: 12.
- En una realización, B_2 consiste en la secuencia de 27185 pb a 28165 pb de SEQ ID NO: 12.
- 35 B_X , tal como se emplea en el presente documento, se refiere a la secuencia de ADN en la proximidad del extremo 5' del gen L5 en BB. En las proximidades o próximo al extremo 5' del gen L5, tal como se emplea en la presente, hace referencia a: adyacente (contiguo) al extremo 5' del gen L5 o a una región no codificadora asociada inherentemente en este documento, es decir adyacente o contigua al extremo principal 5' del gen L5 o a una región no codificadora asociada inherentemente con el mismo. Alternativamente, en las proximidades de, o próximo a, puede referirse a estar cerca del gen L5, de manera que no haya secuencias codificantes entre la región B_X y el extremo 5' del gen L5.
- 40 Por lo tanto, en una realización, B_X se une directamente a una base de L5 que representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia de codificación del gen L5.
- Por lo tanto, en una realización, B_X se une directamente a una base de L5 que representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia no codificante, o se une directamente a una región no codificante asociada de forma natural con L5. Una región no codificante asociada naturalmente a L5, como se emplea en la presente memoria, se refiere a parte de todas las regiones no codificantes que forman parte del gen L5 o son contiguas a ellas pero no son parte de otro gen.
- 45 En una realización, B_X comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10. Esta secuencia es una secuencia artificial no codificante en la que se puede insertar una secuencia de ADN, que comprende, por ejemplo, un transgén (o casete transgénico), un sitio de restricción o una combinación de los mismos. Esta secuencia es ventajosa porque actúa como un amortiguador que permite cierta flexibilidad en la ubicación exacta del transgén minimizando al mismo tiempo los efectos perjudiciales sobre la estabilidad y viabilidad del virus.
- 50 La(s) inserción(inserciones) pueden ocurrir en cualquier lugar dentro de la SEQ ID NO: 10 desde el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto entre bp 1 a 201, por ejemplo entre las pares de bases 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24,

24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, 34/35, 35/36, 36/37, 37/38, 38/39, 39/40, 40/41, 41/42, 42/43, 43/44, 44/45, 45/46, 46/47, 47/48, 48/49, 49/50, 50/51, 51/52, 52/53, 53/54, 54/55, 55/56, 56/57, 57/58, 58/59, 59/60, 60/61, 61/62, 62/63, 63/64, 64/65, 65/66, 66/67, 67/68, 68/69, 69/70, 70/71, 71/72, 72/73, 73/74, 74/75, 75/76, 76/77, 77/78, 78/79, 79/80, 80/81, 81/82, 82/83, 83/84, 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 88/89, 89/90, 90/91, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96, 96/97, 97/98, 98/99, 99/100, 100/101, 101/102, 102/103, 103/104, 104/105, 105/106, 106/107, 107/108, 108/109, 109/110, 110/111, 111/112, 112/113, 113/114, 114/115, 115/116, 116/117, 117/118, 118/119, 119/120, 120/121, 121/122, 122/123, 123/124, 124/125, 125/126, 126/127, 127/128, 128/129, 129/130, 130/131, 131/132, 132/133, 133/134, 134/135, 135/136, 136/137, 137/138, 138/139, 139/140, 140/141, 141/142, 142/143, 143/144, 144/145, 145/146, 146/147, 147/148, 148/149, 150/151, 151/152, 152/153, 153/154, 154/155, 155/156, 156/157, 157/158, 158/159, 159/160, 160/161, 161/162, 162/163, 163/164, 164/165, 165/166, 166/167, 167/168, 168/169, 169/170, 170/171, 171/172, 172/173, 173/174, 174/175, 175/176, 176/177, 177/178, 178/179, 179/180, 180/181, 181/182, 182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188, 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195, 195/196, 196/197, 197/198, 198/199, 199/200 o 200/201.

5 En una realización, B_x comprende la SEQ ID NO: 10 con una secuencia de ADN insertada entre bp27 y bp28 o un lugar correspondiente entre las posiciones 28192bp y 28193bp de SEQ ID NO: 12.

20 En una realización, el inserto es un inserto de sitio de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 pb que comprende 2 sitios de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 9 pb que comprende 1 sitio de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 pb que comprende 2 sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 9 pb que comprende 1 sitio de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno, dos o tres transgenes, tal como uno o dos. En una realización, dos sitios de restricción intercalan uno o más, tales como dos transgenes (por ejemplo, en un casete transgénico). En una realización, cuando B_x comprende dos sitios de restricción, dichos sitios de restricción son diferentes entre sí. En una realización, dichos uno o más sitios de restricción en B_x no se producen de forma natural en el genoma de adenovirus particular en el que se han insertado. En una realización, dichos uno o más sitios de restricción en B_x son diferentes a otros sitios de restricción ubicados en otras partes del genoma del adenovirus, por ejemplo, son diferentes a los sitios de restricción naturales y/o sitios de restricción introducidos en otras partes del genoma, tales como un sitio de restricción introducido en B_y. Por lo tanto, en una realización, el sitio o sitios de restricción permiten que el ADN en la sección se corte específicamente.

Ventajosamente, el uso de sitios de restricción "únicos" proporciona selectividad y control sobre el lugar donde se corta el genoma del virus, simplemente usando la enzima de restricción apropiada.

35 El corte específico, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a que el uso de una enzima específica para los sitios de restricción corta el virus solo en la ubicación deseada, usualmente una ubicación, aunque ocasionalmente puede ser un par de ubicaciones. Un par de ubicaciones, tal como se emplean en este documento, se refiere a dos sitios de restricción en proximidad entre sí que están diseñados para ser cortados por la misma enzima (es decir, no pueden diferenciarse entre sí).

40 En una realización, el inserto del sitio de restricción es la SEQ ID NO: 55.

En una realización, B_x tiene la secuencia de 28166 pb a 28366 pb de SEQ ID NO: 12.

En una realización, B_x es un enlace.

45 B_B, como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica la región L5. Como se emplea en este documento, la región L5 se refiere a la secuencia de ADN que contiene el gen que codifica la fibra polipéptido/proteína, según corresponda en el contexto. El gen/región de la fibra codifica la proteína de la fibra que es un componente principal de la cápside de los adenovirus. La fibra funciona en el reconocimiento del receptor y contribuye a la capacidad del adenovirus para unirse selectivamente e infectar células.

En los virus de la presente descripción, la fibra es de un virus del grupo B, en particular Ad11, tal como Ad11p.

En una realización, B_B tiene la secuencia de 28367 pb a 29344 pb de SEQ ID NO: 12.

50 La secuencia de ADN en relación con B_y, como se emplea en la presente memoria, se refiere a la secuencia de ADN en las proximidades del extremo 3' del gen L5 de BB. En la proximidad o próximo al extremo 3' del gen L5, como se emplea en la presente memoria, se refiere a: adyacente (contiguo) al extremo 3' del gen L5 o a una región no codificante asociada inherentemente a la misma, es decir adyacente o contigua al extremo principal 3' del gen L5 o una región no codificante asociada inherentemente al mismo (es decir, toda o parte de una secuencia no codificante endógena a L5). Alternativamente, en las proximidades de, o próximo a, puede referirse a estar cerca del gen L5, de manera que no haya secuencias codificantes entre la región B_y y el extremo 3' del gen L5.

Por lo tanto, en una realización, B_γ se une directamente a una base de L5 que representa el "extremo" de una secuencia codificante.

Por lo tanto, en una realización, B_γ se une directamente a una base de L5 que representa el "extremo" de una secuencia no codificante, o se une directamente a una región no codificante asociada de forma natural con L5.

- 5 Intrínseca y naturalmente se usan indistintamente en este documento. En una realización, B_γ comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11. Esta secuencia es una secuencia no codificante en la que se puede insertar una secuencia de ADN, que comprende, por ejemplo, un transgén (o casete transgénico), un sitio de restricción o una combinación de los mismos. Esta secuencia es ventajosa porque actúa como un amortiguador que permite cierta flexibilidad en la ubicación exacta del transgén minimizando al mismo tiempo los efectos perjudiciales sobre la estabilidad y viabilidad del virus.
- 10

La(s) inserción(inserciones) pueden ocurrir en cualquier lugar dentro de la SEQ ID NO: 11 desde el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto entre bp 1 y 35, por ejemplo, entre las pares de bases 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10, 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18, 18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26, 26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, o 34/35.

- 15 En una realización, B_γ comprende la SEQ ID NO: 11 con una secuencia de ADN insertada entre las posiciones bp 12 y 13 o un lugar correspondiente a 29356 pb y 29357 pb en la SEQ ID NO: 12. En una realización, el inserto es un inserto de sitio de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 pb que comprende 2 sitios de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 9 pb que comprende 1 sitio de restricción. En una realización, el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos o tres transgenes, tal como uno o dos transgenes. En una realización, el sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 19 pb que comprende 2 sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, el inserto de sitio de restricción es un inserto de sitio de restricción de 9 pb que comprende 1 sitio de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una realización, dos sitios de restricción intercalan uno o más, tales como dos transgenes (por ejemplo, en un casete transgénico). En una realización, cuando B_γ comprende dos sitios de restricción, dichos sitios de restricción son diferentes entre sí. En una realización, dichos uno o más sitios de restricción en B_γ son de origen no natural (como únicos) en el genoma de adenovirus particular en el que se han insertado. En una realización, dichos uno o más sitios de restricción en B_γ son diferentes a otros sitios de restricción localizados en otras partes en el genoma del adenovirus, por ejemplo, diferentes a los sitios de restricción de origen natural o sitios de restricción introducidos en otras partes del genoma, tales como B_x. Por lo tanto, en una realización, el sitio o sitios de restricción permiten que el ADN en la sección se corte específicamente.
- 20
- 25
- 30

En una realización, el inserto del sitio de restricción es la SEQ ID NO: 54.

En una realización, B_γ tiene la secuencia de 29345 pb a 29379 pb de SEQ ID NO: 12.

- 35 En una realización, B_γ es un enlace.

En una realización, el inserto es después de pb 12 en SEQ ID NO: 11.

En una realización, el inserto está en aproximadamente la posición 29356 pb de SEQ ID NO: 12.

En una realización, el inserto es un casete transgénico que comprende uno o más transgenes, por ejemplo 1, 2 ó 3, tal como 1 ó 2.

- 40 E4, como se emplea en este documento, se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o toda la región E4 de un adenovirus (es decir, la región del polipéptido/proteína), que puede mutarse de forma que la proteína codificada por el gen E4 tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, y tenga la misma función que el tipo silvestre (la proteína correspondiente no mutada); aumento de la función en comparación con la proteína de tipo salvaje; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo salvaje o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo salvaje o una combinación de las mismas, según corresponda.
- 45

En una realización, la región E4 está parcialmente delecionada, por ejemplo, está delecionada un 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35 %, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5%. En una realización, la región E4 tiene la secuencia de 32188 pb a 29380 pb de SEQ ID NO: 12.

En una realización, B₃ es un enlace, es decir, en donde E4 está ausente.

- 50 En una realización, B₃ tiene la secuencia que comprende de 32188 pb a 29380 pb de SEQ ID NO: 12.

Como se emplea en este documento, los intervalos de números incluyen los puntos finales.

El experto apreciará que los elementos en las fórmulas de la presente, tales como la fórmula (I), son contiguos y pueden incorporar secuencias de ADN no codificantes, así como los genes y las secuencias de ADN codificantes

(características estructurales) mencionadas en este documento. En una o más realizaciones, las fórmulas de la presente descripción intentan describir una secuencia natural en el genoma del adenovirus. En este contexto, será evidente para el experto en la materia que la fórmula se refiere a los elementos principales que caracterizan la sección relevante del genoma y no pretende ser una descripción exhaustiva del tramo genómico del ADN.

- 5 E1A, E1B, E3 y E4, como se emplean en este documento, se refieren independientemente a las formas de tipo salvaje y equivalentes de las mismas, mutadas o parcialmente eliminadas de cada región como se describe en este documento, en particular una secuencia de tipo silvestre de un adenovirus conocido.

- 10 "Inserto", como se emplea en este documento, se refiere a una secuencia de ADN que se incorpora en el extremo 5', el extremo 3' o dentro de un segmento de referencia de secuencia de ADN dado de manera que interrumpe la secuencia de referencia. Este último es una secuencia de referencia empleada como punto de referencia en relación con el cual se ubica el inserto. En el contexto de la presente descripción, los insertos se producen generalmente dentro de la SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11. Un inserto puede ser un inserto de sitio de restricción, un casete transgénico o ambos. Cuando la secuencia se interrumpe, el virus aún comprenderá la secuencia original, pero en general será como dos fragmentos intercalando el inserto.

- 15 En una realización, el transgén o casete transgénico no comprende un transposón de inserción no polarizado, tal como un transposón TN7 o parte del mismo. El transposón Tn7, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un transposón de inserción no polarizado como se describe en el documento WO2008/080003.

Sitios de restricción

- 20 Los sitios de restricción en las ubicaciones descritas en este documento (por ejemplo en B_x y/o B_y) son útiles en virus y construcciones de la presente descripción, tales como plásmidos, porque permiten que el transgén se cambie rápidamente y, por ejemplo, selectivamente cuando los sitios de restricción alrededor del transgén(s) sean únicos.

Único, como se emplea en este documento, se refiere a una sola ocurrencia en el conjunto del virus o constructo.

En una realización, el transgen o casete transgénico comprende un sitio de restricción en cada extremo, permitiendo de este modo que el casete sea reemplazado.

- 25 Un sitio de restricción es una ubicación en una secuencia de ADN que puede cortarse mediante una enzima de restricción, generalmente una enzima específica de la secuencia. En una realización, el sitio de restricción comprende de 3 a 22 pares de bases, por ejemplo de 4 a 22, tales como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 pares de bases. Los ejemplos de sitios de restricción cortados por enzimas de restricción incluyen, pero no están limitados a:

- 30 - secuencia GCGGCCGC cortada por NotI y CciNI dejando los salientes 5' -GGCC
 - secuencia GGCCGGCC cortada por FseI y RgiI dejando los salientes 3' -CCGG
 - secuencia GCGATCGC cortada por AsiSI, RgaI, SgfI y SfaI dejando los salientes 3' -AT
 - secuencia CCTGCAGG cortada por SbfI, SdaI y Sse83871 dejando los salientes 3' - TGCA
 - secuencia TGATCA cortada por BclI, FbaI, Ksp221 y BsiQ1 dejando los salientes 5' - GATC
- 35 - secuencia CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG [SEQ ID NO: 74] cortada por I-Cre1 dejando los salientes 3' - GTGA
 - secuencia TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAA [SEQ ID NO: 75] cortada por I-CeuI dejando los salientes 3' CTAA
 - secuencia TAGGGATAACAGGGTAAT [SEQ ID NO: 76] cortada por I-Sce1 dejando los salientes 3' ATAA
 - secuencia GCCCGGGC cortada por SrfI dejando extremos romos
- 40 - secuencia GTTTAAAC cortada por MssI, PmeI dejando extremos romos
 - secuencia ATTTAAAT cortada por SmaI, SmlI dejando extremos romos
 - secuencia GGCGCGCC cortada por AscI, PstI y SgsI dejando los salientes 5' CGCG

Otras enzimas de restricción que corten los mismos sitios de reconocimiento también pueden ser adecuadas.

- 45 En una realización, uno o más sitios de restricción en B_x y B_y se seleccionan independientemente de un sitio de restricción específico para una enzima descrita en este documento, por ejemplo NotI, FseI, AsiSI, SgfI y SbfI, en particular, los sitios de restricción insertados son todos diferentes, tales como los sitios específicos para NotI y los sitios específicos para FseI ubicados en B_x y SgfI y SbfI ubicados en B_y.

Como se discutió anteriormente en una realización, la región B_x y/o B_y no comprende un sitio de restricción. Ventajosamente, los virus y las construcciones de la presente descripción pueden prepararse sin sitios de restricción, por ejemplo usando técnicas sintéticas. Estas técnicas permiten una gran flexibilidad en la creación de virus y construcciones. Además, los presentes inventores han establecido que las propiedades de los virus y constructos no disminuyen cuando se preparan mediante técnicas sintéticas.

Promotores

El promotor, como se emplea en la presente memoria, significa una región de ADN que inicia la transcripción de un gen o genes particulares. Los promotores generalmente se localizan próximos a los genes que transcriben, en la misma cadena y corriente arriba (es decir, 5') en el ADN. Próximo, como se emplea en este contexto, significa lo suficientemente cerca como para funcionar como un promotor. En una realización, el promotor está dentro de 100 pb del sitio de inicio de la transcripción. De este modo, el promotor endógeno, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un promotor que se produce naturalmente en (es decir, es nativo de) el adenovirus (o construcción) en el que se está insertando el transgén. En una o más realizaciones, el promotor endógeno empleado es el promotor natural en el virus en su ubicación original en el genoma del virus, en particular este es el promotor primario o único empleado en la expresión del transgén o transgenes. En una realización, el promotor endógeno utilizado para promover la traducción y opcionalmente la transcripción del transgén es uno integrado en el genoma del adenovirus y no se ha introducido previamente mediante técnicas recombinantes.

Bajo el control de un promotor endógeno, como se emplea en la presente memoria, se refiere a donde el transgen/casete transgénico se inserta en la orientación apropiada para estar bajo el control de dicho promotor endógeno. Es decir, cuando el promotor está generalmente en la cadena antisentido, el casete se inserta, por ejemplo, en la orientación antisentido.

Habiendo dicho esto, los genes se pueden expresar en una de dos orientaciones. Sin embargo, generalmente una orientación proporciona mayores niveles de expresión sobre la otra orientación, para un transgén determinado (particular).

En una realización, el casete está en la orientación de sentido. Es decir, se transcribe en una dirección de 5' a 3'. En una realización, el casete está en la orientación antisentido. Es decir, transcrito en la orientación 3' a 5'.

Los promotores endógenos en el virus pueden, por ejemplo, utilizarse utilizando un gen que codifique un transgén y una secuencia aceptora de empalme. Por lo tanto, en una realización, el casete comprenderá una secuencia aceptora de empalme cuando esté bajo el control de un promotor endógeno. Por lo tanto, en una realización, la secuencia codificante, por ejemplo, la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo comprende además una secuencia aceptora de empalme.

En una realización, el transgen, los transgenes o el casete transgénico están bajo el control de un promotor E4 o un promotor tardío principal, tal como el promotor tardío principal (promotor ML).

Bajo el control, tal como se emplea en la presente memoria, significa que el transgén se activa, es decir, se transcribe, cuando un promotor particular lo dicta.

El promotor tardío principal (promotor ML o MLP), como se emplea en la presente memoria, se refiere al promotor de adenovirus que controla la expresión de los genes "expresados tarde", tal como el gen L5. El MLP es un promotor de "cadena sentido". Es decir, el promotor influye en los genes que están aguas abajo del promotor en la dirección 5'-3'. El promotor principal tardío, como se emplea en este documento, se refiere al promotor principal tardío original localizado en el genoma del virus.

El promotor de E4, como se emplea en este documento, se refiere al promotor de adenovirus de la región E4. La región E4 es una región antisentido; por lo tanto, el promotor es un promotor antisentido. Es decir, el promotor está aguas arriba de la región E4 en la dirección 3'-5'. Por lo tanto, cualquier casete transgénico controlado por el promotor E4 puede necesitar orientarse apropiadamente. En una realización, el casete bajo el control del promotor E4 está en la orientación antisentido. En una realización, el casete está bajo el control del promotor E4 en la orientación de sentido. El promotor E4, como se emplea en la presente memoria, se refiere al promotor E4 original localizado en el genoma del virus.

Por tanto, en una realización se proporciona un adenovirus oncolítico competente en replicación serotipo 11 (tal como Ad11p) o derivado de virus del mismo, en el que la fibra, hexón y cápside son del serotipo 11 (tal como Ad11p), en donde el genoma del virus comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a anticuerpo, en el que dicha secuencia de ADN bajo el control de un promotor endógeno al adenovirus seleccionado consiste en E4 y el promotor tardío principal (es decir, el promotor E4 o el promotor tardío principal), de modo que el transgén no interfiera con la replicación del virus, por ejemplo, se asocia con la región L5 (es decir, antes o después de dicha región), tal como se localiza después de L5 en el genoma del virus, por ejemplo como se muestra en SEQ ID NO: 1 a 9, 46, 48 a 53, 56 a 63, 66-69 y 72-73.

En una realización, se introduce un promotor endógeno en el genoma viral en una ubicación deseada mediante

técnicas recombinantes, por ejemplo, se introduce en el casete transgénico. Sin embargo, en el contexto de la presente memoria descriptiva, esta disposición se denominará generalmente promotor exógeno.

5 En una realización, el casete transgénico comprende un promotor exógeno. El promotor exógeno, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un promotor que no se produce naturalmente en el adenovirus en el que se está insertando el transgén. Típicamente, los promotores exógenos son de otros virus o son promotores de mamíferos. El promotor exógeno, como se emplea en la presente memoria, significa un elemento de ADN, normalmente localizado aguas arriba del gen de interés, que regula la transcripción del gen.

10 En una realización, el regulador de la expresión génica es un promotor exógeno, por ejemplo, CMV (promotor de citomegalovirus), CBA (promotor de beta actina de pollo) o PGK (promotor de fosfoglicerato quinasa 1), tal como el promotor de CMV.

En una realización, el promotor exógeno CMV empleado tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13. En una realización, el promotor exógeno PGK empleado tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14. En una realización, el promotor exógeno CBA empleado tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

15 En una realización, se proporciona un adenovirus oncolítico competente en replicación serotipo 11 (tal como Ad11p) o un derivado del virus en el que la fibra, hexón y cápside son del serotipo 11 (tal como Ad11p), en donde el genoma del virus comprende una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a anticuerpo localizado en una parte del genoma del virus que se expresa tardíamente en el ciclo de replicación del virus y tal que el transgén no interfiere con la replicación del virus, en donde dicha secuencia de ADN está bajo el control de un promotor exógeno al adenovirus (por ejemplo, el promotor CMV). En una realización, la secuencia de ADN, que codifica un anticuerpo o fragmento, está asociada con la región L5, como se describe en otras partes de este documento.

25 En una realización, el promotor exógeno es un promotor de células presentadoras de antígenos. El promotor de células presentadoras de antígenos, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un promotor para un gen que se expresa selectivamente mediante células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas o macrófagos. Tales genes incluyen, pero no están limitados a: FLT-3, ligando de FLT-3, TLR, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, ligando de GITR, IFN- α 2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, receptor de TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 o CD304; mediadores de procesamiento y presentación de antígenos, tales como CTIIA o GILT. Por lo tanto, en una realización, el promotor exógeno es adecuado para la expresión selectiva de transgenes en dichas células presentadoras de antígeno.

Otras secuencias regulatorias

"Regulador de expresión génica" (o regulador/elemento regulador), como se emplea en la presente memoria, se refiere a una característica genética, tal como un promotor, potenciador o una secuencia aceptora de empalme que desempeña un papel en la expresión génica, típicamente iniciando o potenciando la transcripción o traducción.

35 "Secuencia aceptora de empalme", "aceptor de empalme" o "sitio de empalme", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia reguladora que determina cuándo se reconocerá una molécula de ARNm por ribonucleoproteínas nucleares pequeñas del complejo complejo de corte y empalme. Una vez ensamblado, el complejo de corte y empalme cataliza el empalme entre el sitio aceptor de corte y empalme de la molécula de ARNm a un sitio donador de empalme aguas arriba produciendo una molécula de ARNm madura que puede traducirse para producir un único polipéptido o proteína.

Pueden emplearse secuencias aceptoras de empalme de diferentes tamaños en la presente invención y estas pueden describirse como aceptor de empalme corto (pequeño), aceptor de empalme (medio) y aceptor de empalme ramificado (grande).

45 SSA, como se emplea en este documento, significa un aceptor de empalme corto, que típicamente comprende solo el sitio de empalme, por ejemplo, 4 bp. SA, como se emplea en este documento, significa un aceptor de empalme, que comprende típicamente el aceptor de corte y empalme corto y el tracto de polipirimidina, por ejemplo, 16 bp. bSA, como se emplea en este documento, significa un aceptor de corte y empalme ramificado, que comprende típicamente el aceptor de corte y empalme corto, el tramo de polipirimidina y el punto de bifurcación, por ejemplo, 26 bp.

50 En una realización, el aceptor de empalme empleado en las construcciones de la descripción se muestra en la SEQ ID NO: 16 a 18. En una realización, el SSA tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16. En una realización, la SA tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17. En una realización, la bSA tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18. En una realización, la secuencia aceptora de empalme se selecciona independientemente del grupo que comprende: TGCTAATCTT CCTTTCTCTC TTCAGG (SEQ ID NO: 18), CCTTTCTCTCTT CAGG (SEQ ID NO: 17) y CAGG (SEQ ID NO: 16).

55 En una realización, el sitio de empalme se desarrolla inmediatamente (es decir, se sigue en una dirección de 5' a 3')

mediante una secuencia Kozak de consenso que comprende CCACC. En una realización, el sitio de empalme y la secuencia de Kozak están intercalados en hasta 100 bp, o menos. En una realización, la secuencia de Kozak tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 45.

5 Típicamente, cuando está bajo el control de un promotor endógeno o exógeno (tal como un promotor endógeno), la secuencia codificante estará precedida inmediatamente por una secuencia de Kozak. El inicio de la región de codificación está indicado por el codón de iniciación (AUG), por ejemplo, está en el contexto de la secuencia (gcc)gccRccAUGg [SEQ ID NO: 77] el comienzo del inicio de las secuencias de codificación está indicado por las bases en negrita. Una letra minúscula denota bases comunes en esta posición (que pueden, sin embargo, variar) y las letras mayúsculas indican bases muy conservadas, es decir, la secuencia 'AUGG' es constante o rara vez, si alguna vez, cambia; 'R' indica que generalmente se observa una purina (adenina o guanina) en esta posición y la secuencia entre paréntesis (gcc) tiene una importancia incierta. Por lo tanto, en una realización, el codón de iniciación AUG se incorpora en una secuencia de Kozak.

15 La secuencia de ADN de entrada de ribosoma interna, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de entrada de ribosoma interna (IRES). IRES, como se emplea en la presente memoria, significa una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción de una secuencia de ARN mensajero (ARNm), que incluye el inicio de la iniciación dentro de una secuencia de ARNm. Esto es particularmente útil cuando el casete codifica ARNm policistrónico. El uso de un IRES da como resultado un ARNm policistrónico que se traduce en múltiples proteínas o péptidos individuales. En una realización, la secuencia de ADN de entrada de ribosoma interno tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19. En una realización, un IRES particular solo se usa una vez en el genoma. Esto puede tener beneficios con respecto a la estabilidad del genoma.

25 El "péptido 2A de alta eficacia de autoescisión" o "péptido 2A", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un péptido que se escinde eficientemente después de la traducción. Los péptidos 2A adecuados incluyen P2A, F2A, E2A y T2A. Los presentes inventores han notado que una vez que se usa una vez una secuencia específica de ADN que codifica un péptido 2A dado, la misma secuencia específica de ADN puede no usarse una segunda vez. Sin embargo, la redundancia en el código de ADN puede utilizarse para generar una secuencia de ADN que se traduce en el mismo péptido 2A. El uso de péptidos 2A es particularmente útil cuando el casete codifica ARNm policistrónico. El uso de péptidos 2A da como resultado la traducción de una única cadena polipeptídica que se modifica después de la traducción para generar múltiples proteínas o péptidos individuales.

30 En una realización, el péptido P2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En una realización, el péptido F2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En una realización, el péptido E2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27. En una realización, el péptido T2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

35 En una realización, un ARNm o cada ARNm codificado por el transgén es/son una secuencia de señal de poliadenilación, tal como típicamente al final de una secuencia de ARNm, por ejemplo, como se muestra en la SEQ ID N°: 20. De este modo, una realización, el transgén o el casete transgénico comprenden, al menos, una secuencia que codifica una secuencia de señal de poliadenilación.

"PoliA", "señal de poliadenilación" o "secuencia de poliadenilación", como se emplea en la presente memoria, significa una secuencia de ADN, que contiene habitualmente un sitio AATAAA, que una vez transcrito, puede reconocerse por un complejo multiproteico que escinde y poliadenila la molécula de ARNm naciente.

40 En una realización, la secuencia de poliadenilación tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 20.

En una realización, la construcción no incluye una secuencia de poliadenilación. En una realización, el regulador de la expresión génica es una secuencia aceptora de empalme.

En una realización, la secuencia que codifica una proteína/polipéptido/péptido, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende además una señal de poliadenilación.

45 Codificaciones transgénicas

50 En una realización, el transgén o transgenes codifican independientemente una proteína, péptido, molécula de ARN, tal como una molécula de ARN. Ventajosamente, el transgén puede administrarse intracelularmente y posteriormente puede transcribirse y, si es apropiado, traducirse. Los ejemplos de material genético codificado por un transgén incluyen, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos, quimiocinas, citoquinas, inmunomoduladores, enzimas (por ejemplo, capaces de convertir un profármaco en un agente activo) y una molécula de ARNi.

55 El péptido, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos de 2 a 50 residuos, por ejemplo de 5 a 20 residuos. El polipéptido, como se emplea en este documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos de más de 50 residuos sin estructura terciaria, en particular, sin estructura secundaria y terciaria. La proteína se refiere a una secuencia de aminoácidos de más de 50 residuos, con estructura secundaria y/o terciaria, en particular, con estructura secundaria y terciaria.

En una realización, la secuencia codificante codifica un ARN terapéutico, péptido terapéutico, polipéptido terapéutico o proteína terapéutica (es decir, es un gen terapéutico).

5 El gen terapéutico, como se emplea en este documento, significa un gen que codifica una entidad que puede ser útil en el tratamiento, mejora o prevención de la enfermedad, por ejemplo, el gen expresa una proteína terapéutica, polipéptido, péptido o ARN, que al menos ralentiza, detiene o invierte la progresión de una enfermedad, tal como el cáncer.

10 En una realización, la entidad codificada por el transgén, cuando se transcribe o traduce en una célula, tal como una célula cancerosa, aumenta la producción de señales de peligro por la célula. "Señales de peligro", como se emplea en este documento, se refiere a una variedad de moléculas producidas por células que sufren daños, estrés o muerte no apoptótica que actúan como señales de alarma, por ejemplo estimulando células del sistema inmune innato para responder directamente y para mejorar la activación de las células del sistema inmune adaptativo.

Se sabe que el microambiente de los tumores a menudo cambia de tal manera que las respuestas inmunitarias humanas naturales son reguladas negativamente. Por lo tanto, la capacidad de reiniciar las respuestas inmunes dentro del tumor es potencialmente muy interesante en el tratamiento del cáncer.

15 En una realización, el péptido o proteína terapéutica codificada se diseña para secretarse en el entorno extracelular. En una realización, el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína, tal como el anticuerpo, se libera en el microambiente externo de la célula, por ejemplo en el sobrenadante del cultivo, o in vivo: tejido, estroma, circulación, sangre y/o sistema linfático.

20 En una realización, el péptido, polipéptido o proteína, codificado por el transgén, comprende una secuencia señal. El péptido señal, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia peptídica corta de 13-36 restos situada en el extremo N de proteínas que ayudan a la entrada de la proteína en la ruta secretora para la secreción o expresión de la membrana. En una realización, la secuencia líder (péptido señal) tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 ó 22.

25 En otra realización, el péptido o proteína terapéutico codificado, tal como un anticuerpo, se diseña para expresarse como una forma anclada a la membrana en la membrana superficial de la célula, por ejemplo, incluyendo la codificación de un dominio transmembrana en la proteína o un sitio para la unión de un ancla de membrana lipídica.

30 En una realización, el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como un anticuerpo, se libera de la célula infectada por el adenovirus, por ejemplo, mediante secreción activa o como resultado de la lisis celular. Por lo tanto, en una realización, el adenovirus lisa la célula, liberando de ese modo el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como el anticuerpo.

En otra realización, el péptido o proteína terapéutica codificada, tal como un anticuerpo, se diseña para retenerse dentro de la célula intacta.

35 Ventajosamente, el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como anticuerpos expresados por adenovirus de la presente descripción, se pueden detectar en tejido in vivo tanto como ARNm (véase la figura 16, figura 41C) como proteína de anticuerpo (véase figura 17A, figura 35B). Además, el ARN, péptido o proteína funcional expresado, tal como el anticuerpo, puede unirse a su ligando en ELISA (véase la figura 17B). Además, el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como el anticuerpo, es detectable temprano (3 días después de la infección, véase la figura 18B) y la expresión se mantiene durante varias semanas (véanse las figuras 17 y 18B).

40 En una realización, los adenovirus de la presente descripción expresan el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como anticuerpos, dentro de aproximadamente 3 días o más de infección, tal como dentro de aproximadamente 36, 48, 60 ó 72 horas, o tal como 2, 3, 4, 5 ó 6 días.

45 En una realización, los adenovirus de la presente descripción expresan el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como anticuerpos, durante varias semanas, tal como aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 semanas. Tales como 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ó 42 días.

Ventajosamente, la expresión de ARN, péptido o proteína funcional, tal como la expresión del anticuerpo, es suficientemente alta para poder detectar el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional, tal como el anticuerpo en la sangre (véase la figura 19, figura 35B).

50 En una realización, el ARN, péptido o proteína funcional, tal como los anticuerpos expresados por el adenovirus de la presente descripción, entran en el torrente sanguíneo y/o en el sistema linfático.

En una realización, el adenovirus de la presente descripción es un virus oncolítico que tiene un índice terapéutico mejorado para células cancerosas.

En una realización, la secuencia codificante codifica el ARN funcional, por ejemplo, ARN terapéutico.

El ARN funcional, como se emplea en la presente memoria, se refiere a ARN que tiene una función distinta de codificar una proteína o péptido e incluye, por ejemplo, construcciones de ARN adecuadas para inhibir o reducir la actividad génica, que incluyen ARNi, tales como ARNsh y ARNmi. El ARNsh, como se emplea en la presente memoria, se refiere al ARN de horquilla corta que es una secuencia de ARN que hace un giro cerrado en forma de horquilla que puede usarse para silenciar la expresión del gen diana a través de la interferencia del ARN (ARNi). El ARNmi (ARNmicro), como se emplea en la presente memoria, se refiere a una pequeña molécula de ARN no codificante (que contiene aproximadamente 22 nucleótidos) que funciona, mediante emparejamiento de bases con secuencias complementarias dentro de moléculas de ARNm, para regular la expresión génica a nivel transcripcional o postranscripcional. Las cadenas de ARNm unidas por miARN se silencian porque los ribosomas ya no pueden traducirlas en proteínas, y dichos complejos a menudo son desmontados activamente por la célula.

En una realización, el transgén codifica una proteína. La proteína, como se emplea en este documento, incluye un ligando de proteína, un receptor de proteína o una molécula de anticuerpo.

El ligando proteico, como se emplea en la presente memoria, se refiere a la membrana de la superficie celular o sus fragmentos de unión de proteínas secretadas, que se unen o se ligan a los receptores celulares para influir en la función de la célula, por ejemplo, estimulando la señalización intracelular y modulando la transcripción del gen dentro de la célula. En una realización, la proteína expresada se modifica por ingeniería genética para que se exprese en la superficie de la célula y/o se segregue desde la célula.

En una realización, la proteína codificada es una enzima, por ejemplo, una enzima que ayuda a degradar la matriz extracelular del tumor, por ejemplo, una ADNasa, una colagenasa, una metaloproteinasa de matriz (tal como MMP2 o 14) o similar.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos adecuados pueden ser agonistas o antagonistas e incluyen aquellos con actividad anticancerígena y aquellos que modifican las respuestas de la célula huésped al cáncer, por ejemplo: un anticuerpo agonista o antagonista o fragmento de anticuerpo puede disminuir la vascularización o normalizar la vascularización del tumor. En una realización, los anticuerpos agonísticos u otras proteínas codificadas pueden hacer que la célula huésped sea más visible para las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del huésped, por ejemplo, expresando antígenos, señales de peligro, citoquinas o quimiocinas para atraer y activar la misma, o uniéndose a moléculas estimulantes o de punto de control para mejorar las respuestas inmunes adaptativas.

El anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a anticuerpo, como se emplea en este documento, se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a anticuerpo que, cuando se inserta en el virus oncolítico, tiene un impacto beneficioso sobre la patología en el paciente, por ejemplo, sobre el cáncer que se está tratando.

Impacto beneficioso, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un efecto deseable y/o ventajoso del anticuerpo que se expresa in vivo.

Las clases de anticuerpos terapéuticos y fragmentos de unión a anticuerpos incluyen: anticuerpos anti-EGF, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-PDGF, anticuerpos anti-CTLA, anticuerpos anti-PD1, anticuerpos anti-PDL1 y anticuerpos anti-FGF.

Los anticuerpos terapéuticos registrados adecuados para la incorporación en virus de la presente descripción incluyen: abciximab, adalimumab, alemtzumab, basiliximab, belimumab, bevacizumab, brentuximab vedotin, canakinumab, cetuximab, certolzumab, daclizumab, denosumab, eculzumab, efalixumab, gemtuzumab, golimumab, ibritumomab tiuxetan, infliximab, ipilimumab, muromonab-CD3, ofatumumab, palivizumab, panitumumab, ranibizumab, rituximab, tocilizumab, tositumomab y trastuzumab.

En una realización, las secuencias de la región variable del anticuerpo de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo empleado son entre 95 y 100% similares o idénticas a las regiones variables de bevacizumab (también conocido como Avastin®), tales como 96, 97, 98 ó 99% similares o idénticas.

También son adecuadas para la incorporación en los virus de la presente descripción las secuencias codificantes para aquellos anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos que están aprobados para indicaciones del cáncer, por ejemplo, trastuzumab, tositumomab, rituximab, panitumumab, ofatumumab, ipilimumab, ibritumomab tiuxetan, gemtuzumab, denosumab, cetuximab, brentuximab vedotin, avastin y adalimumab.

En una realización, las secuencias de la región variable del anticuerpo de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo empleado son entre 95 y 100% similares o idénticas a las regiones variables de un anticuerpo conocido o un anticuerpo descrito en este documento.

Como se usa en el presente documento, "molécula de anticuerpo" incluye anticuerpos y fragmentos de unión de los mismos.

El anticuerpo, como se emplea en este documento, generalmente se refiere a un anticuerpo de longitud completa y formatos biespecíficos o multiespecíficos que comprenden el mismo.

Los fragmentos de unión a anticuerpos incluyen un fragmento de anticuerpo capaz de dirigirse al antígeno con la misma especificidad, similar o mejor que el "anticuerpo" original del que se deriva. Los fragmentos de anticuerpo incluyen: Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (p.ej. VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi-, tri- o tetra-valentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9): 1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2 (3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para usar en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades, p.ej., pueden ser biespecíficos o monoespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 92/22853, WO05/113605, WO2009/040562 y WO2010/035012).

Específico, como se emplea en este documento, pretende referirse a un anticuerpo o fragmento que solo reconoce el antígeno al que es específico o a un anticuerpo o fragmento que tiene una afinidad de unión significativamente mayor respecto al antígeno al que es específico en comparación con su afinidad de unión a antígenos para los cuales no es específico, por ejemplo 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor afinidad de unión.

Se pueden emplear anticuerpos conocidos o fragmentos de unión a anticuerpos para generar formatos de anticuerpos alternativos con las mismas CDR o las mismas regiones variables, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa puede convertirse fácilmente en un fragmento Fab, Fab' o scFv.

Se puede emplear una amplia gama de diferentes formas de anticuerpos en las construcciones de la presente descripción que incluyen moléculas de anticuerpos de animales no humanos, moléculas de anticuerpos humanos, moléculas de anticuerpos humanizados y moléculas de anticuerpos quiméricos.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión es monoclonal. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al. 1983, *Immunology Today*, 4:72) y la técnica EBV-hibridoma (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión no es humano, es decir, completamente de origen no humano. Esto es posible porque el virus puede administrar anticuerpos y fragmentos dentro de la célula cancerosa.

En una realización, el anticuerpo es quimérico, por ejemplo, tiene región(s) constante(s) humana(s) y regiones variables no humanas.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión es humano, es decir, de origen completamente humano.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión se humaniza. Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.585.089; WO91/09967). Se apreciará que puede ser necesario solamente transferir los residuos que determinan la especificidad de las CDR en lugar de la CDR completa (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender opcionalmente además uno o más restos estructurales derivados de las especies no humanas, por ejemplo, de los que se derivaron las CDR.

En una realización, la secuencia codificante codifica una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. La cadena pesada (HC), como se emplea en el presente documento, se refiere a la gran subunidad polipeptídica de un anticuerpo. La cadena ligera (LC), como se emplea en la presente memoria, se refiere a la subunidad de polipéptido pequeña de un anticuerpo. En una realización, la cadena ligera del anticuerpo comprende un dominio CL, ya sea kappa o lambda.

Los anticuerpos para uso en la presente descripción se pueden obtener usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El polipéptido/proteína antígeno que incluye proteínas de fusión, incluidas las células que expresan (de forma recombinante o natural) el polipéptido (tales como las células T activadas) pueden usarse para producir anticuerpos que reconozcan específicamente al antígeno. El polipéptido puede ser un polipéptido "maduro" o un fragmento o derivado biológicamente activo del mismo.

Los polipéptidos, que se usan para inmunizar a animales huésped, pueden prepararse por procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células hospedadoras genéticamente modificadas que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se usan indistintamente, a menos que se especifique lo contrario. El polipéptido antigénico puede, en algunos casos, ser parte de una proteína mayor, tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada a un marcador de afinidad.

Se pueden obtener anticuerpos generados contra el polipéptido antigénico, cuando es necesaria la inmunización de un animal, administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y de rutina, véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986. Muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas, camellos o cerdos, pueden ser inmunizados. Sin embargo, los ratones, conejos, cerdos y ratas son generalmente los más adecuados.

Los anticuerpos para usar en la invención también se pueden generar usando métodos de anticuerpo de linfocito único clonando y expresando los ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15): 7843 – 7848; documentos WO92/02551 y WO2004/051268 y la solicitud de patente internacional número WO2004/106377.

El cribado de anticuerpos se puede realizar usando ensayos para medir la unión al antígeno y/o ensayos para medir la capacidad de antagonizar el receptor. Un ejemplo de un ensayo de unión es un ELISA, en particular, usando una proteína de fusión (que comprende opcionalmente un indicador), que está inmovilizada en placas, y que emplea un anticuerpo secundario conjugado para detectar anticuerpos antiantígeno unidos a la proteína de fusión.

Los dominios de región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, pueden seleccionarse teniendo en cuenta la función propuesta de la molécula de anticuerpo y, en particular, las funciones efectoras que pueden requerirse. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser los dominios humanos IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. En particular, se pueden usar los dominios de la región constante de IgG humana, especialmente de los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo se destina a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpo. Alternativamente, los isotipos IgG2 e IgG4 pueden usarse cuando la molécula de anticuerpo se destina a fines terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de anticuerpos, p.ej. para simplemente agonizar la actividad o para la neutralización del objetivo. Se apreciará que también pueden usarse variantes de secuencia de estos dominios de región constante. Por ejemplo, se pueden usar moléculas de IgG4 en las que la serina en la posición 241 se ha cambiado a prolina, como se describe en Angal et al., Molecular Immunology, 1993, 30 (1), 105-108.

Para ciertas funciones de anticuerpos, por ejemplo, para administrar señales de activación a células que portan la molécula diana del anticuerpo, tales como células del sistema inmune, puede ser ventajoso usar versiones del anticuerpo ancladas a la membrana de manera que el anticuerpo se exprese en la superficie de la célula que expresa. Dichas moléculas de unión expresadas en la superficie celular permiten interacciones multiméricas eficaces entre la molécula de señalización diana en la superficie de otra célula que potencia la administración de señales de activación desde la molécula diana a la célula receptora.

Ventajosamente, los adenovirus de la presente descripción pueden expresar formas de anticuerpos de longitud completa y scFv.

En una realización, la secuencia que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende o comprende adicionalmente una secuencia interna de entrada al ribosoma. La secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES), como se emplea en la presente memoria, significa una secuencia de nucleótidos que permite la iniciación de la traducción en el medio de una secuencia de ARN mensajero (ARNm).

En una realización, las proteínas o péptidos terapéuticos codificados son proteínas, polipéptidos o péptidos específicos de diana.

Las proteínas o péptidos específicos de dianas, como se emplean en este documento, se refieren a las propias proteínas diana, o a proteínas o péptidos diferentes que se unen directamente (por ejemplo, son específicos de la diana) o modifican de otra forma los niveles de las proteínas o péptidos diana. Un ejemplo del primero sería una citocina, mientras que un ejemplo de este último sería un anticuerpo contra esa citoquina.

Los objetivos de interés generalmente se refieren a células particulares, productos celulares, antígenos o vías de señalización asociadas con enfermedades, particularmente el cáncer. La diana, dependiendo del contexto, también se refiere a ARNm o similar, transcrito del gen que codifica la proteína o polipéptido, que, por ejemplo, puede inhibirse mediante tecnología de tipo ARNi. Por lo tanto, en el contexto del ARN, tal como la tecnología de ARNi, la diana es el ARNm que está codificado por el gen de la diana.

Los ejemplos de dianas de interés incluyen, pero no se limitan a, co-receptores estimuladores de células T y ligandos a los mismos, moléculas co-receptoras de células T inhibitoras de puntos de control y ligandos a las mismas, receptores y ligandos expresados por las células T reguladoras, células supresoras derivadas de mieloides y células inmunitarias inmunosupresoras, células dendríticas y receptores de células presentadoras de antígeno y ligandos de estos, mediadores de procesamiento y presentación de antígenos, receptores de citocinas y citocinas, receptores de quimioquinas y quimioquinas, factores de transcripción y reguladores de la transcripción, moléculas de tráfico intracelular y reguladores de la función celular, células tumorales y receptores y productos microambientales tumorales, enzimas de células tumorales intracelulares tales comoIDO, antígenos para el reconocimiento por células inmunes.

Por tanto, en una realización, la diana, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una proteína o polipéptido que puede, por ejemplo, inhibirse, neutralizarse o activarse, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, según sea apropiado. La diana, en el contexto de las citosinas, se refiere a una citoquina per se o un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico de la citoquina. Por lo tanto, el virus puede codificar y expresar la propia citocina, ya que la liberación de la misma puede estimular respuestas inmunes del "huésped". En el contexto de los ligandos, las formas mutadas del ligando pueden codificarse por el virus que compite con el ligando natural para unirse al receptor. El ligando mutado puede tener una afinidad de unión incrementada por el receptor, por ejemplo, tal que tiene una tasa de desaceleración lenta ocupando así el receptor y aumentando o disminuyendo la señalización desde el mismo. Alternativamente, la actividad del ligando mutado puede reducirse en comparación con el ligando de tipo salvaje, reduciendo de este modo la unión y la actividad global a través del receptor del ligando natural.

En una realización, el virus o la construcción de acuerdo con la presente descripción codifica un profármaco, un inmunomodulador y/o una enzima.

El profármaco, como se emplea en la presente memoria, significa una molécula que se administra como un derivado inactivo (o menos que completamente activo) que posteriormente se convierte en un agente farmacológico activo en el cuerpo, a menudo a través de procesos metabólicos normales. Un pro-fármaco sirve como un tipo de precursor del medicamento deseado. Una enzima convertidora pro-fármaco sirve como la enzima que convierte un pro-fármaco en su forma farmacológicamente activa.

El inmunomodulador, como se emplea en la presente memoria, significa un modulador de la respuesta inmune. Los inmunomoduladores funcionan para ajustar la respuesta inmune a un nivel deseado, como en la inmunopotenciación, inmunosupresión o inducción de la tolerancia inmunológica.

La enzima, tal como se emplea en la presente memoria, significa una sustancia que actúa como un catalizador en organismos vivos, que regula la velocidad a la que se producen las reacciones químicas sin que se altere en el proceso.

Lo siguiente es una discusión no exhaustiva de ejemplos de péptidos/polipéptidos y proteínas diana.

En una realización, la diana es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT o CD160, por ejemplo, CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2. En una realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que es específico de uno de los mismos. Por lo tanto, en una realización, un transgen o casete transgénico codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para CTLA-4, PD-1, PD-L1 o PD-L2. En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para CTLA-4, PD-1, PD-L1 o PD-L2.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo inhibidor de punto de control, por ejemplo, el anti-PD-L1. En una realización, el adenovirus expresa el anticuerpo PD-L1 antihumano de longitud completa. En una realización, la expresión del anticuerpo PD-L1 anti-humano de longitud completa está bajo el control de un promotor endógeno, tal como el promotor tardío principal (MLP), en particular en la posición By. En una realización, el adenovirus expresa la forma scFv del anticuerpo anti-PD-L1 humano. En una realización, la expresión de una forma scFv del anticuerpo PD-L1 anti-humano está bajo el control de un promotor endógeno, tal como el promotor tardío principal, en particular, en la posición By.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena VH del anticuerpo anti-PD-L1 codificada por un virus o la construcción de la presente descripción es la SEQ ID NO: 30. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada constante del anticuerpo anti-PD-L1 es la SEQ ID NO: 33 ó 34. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena VL del anticuerpo anti-PD-L1 es la SEQ ID NO: 32. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera constante del anticuerpo anti-PD-L1 es SEQ ID NO: 35. En una realización, la secuencia de aminoácidos del fragmento de anticuerpo anti-PD-L1 scFv es SEQ ID NO: 37.

En una realización, se proporciona un virus o constructo de acuerdo con la presente descripción que codifica un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, para un anticuerpo de longitud completa o scFv específico para CTLA-4, por ejemplo, como se ejemplifica en este documento.

En una realización, la diana es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende CD16, CD25, CD33, CD332, CD127, CD31, CD43, CD44, CD162, CD301a, CD301b y Galectina-3. En una realización, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión del mismo específico para el mismo, por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa o un scFv.

En una realización, la diana, por ejemplo, que puede ser dirigida por un anticuerpo o fragmento de unión, es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: FLT-3, ligando de FLT-3, TLR, ligandos de TLR, CCR7, CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD80, CD83, CD86, CD123, CD172a, CD205, CD207, CD209, CD273, CD281, CD283, CD286, CD289, CD287, CXCR4, ligando de GITR, IFN- α 2, IL-12, IL-23, ILT1, ILT2, ILT3, ILT4, ILT5, ILT7, receptor de TSLP, CD141, CD303, CADM1, CLEC9a, XCR1 y CD304.

Ciertos ligandos de TLR tienen la capacidad de estimular respuestas inmunes y, por ejemplo, se emplean como adyuvantes. En una realización, el virus codifica y secreta un ligando TRL.

En una realización, la diana se selecciona de un procesador de antígeno y mediador de presentación de antígeno, por ejemplo, CTIIA o GILT.

- 5 En una realización, la diana, por ejemplo, que puede estar dirigida por un anticuerpo o fragmento de unión, es una diana del cáncer.

En una realización, la diana es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: OX40, ligando de OX40, ligando de CD27, CD28, CD30, CD40, ligando de CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS o ligando de ICOS, por ejemplo, CD40 y ligando de CD40.

- 10 En una realización, el casete transgénico codifica un ligando que comprende CD40 o el ligando de CD40, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ARNsh dirigido a CD40 o al ligando de CD40. En una realización, el adenovirus expresa un ligando que comprende CD40 o el ligando de CD40, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ARNsh dirigido a (específico para) CD40 o el ligando de CD40.

- 15 En una realización, la diana es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35. Interleuquina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TGF β , linfotoxina α (LTA) y GM-CSF.

En una realización, el casete transgénico codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN α , IFN γ , TNF α , TGF β o linfotoxina α (LTA). En una realización, el adenovirus expresa IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN α , IFN γ , TNF α , TGF β o linfotoxina α (LTA).

- 20 En una realización, la secuencia de aminoácidos de IFN γ es la SEQ ID NO: 41. En una realización, la secuencia de aminoácidos de IFN α es la SEQ ID NO: 42. En una realización, la secuencia de aminoácidos de TNF α es la SEQ ID NO: 40.

- 25 En una realización, la diana es una quimioquina, por ejemplo, una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 y CRTH2.

En una realización, el casete transgénico codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 o CXCR4. En el contexto de las quimiocinas, la diana incluye el lugar donde los virus codifican y expresan la quimioquina, por ejemplo, para inducir o aumentar las respuestas inmunitarias del huésped frente al cáncer.

- 30 En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 o CXCR4.

- 35 En una realización, la diana es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: miembros de la familia STAT3, STAT1, STAT4, STAT6, CTIIA, MyD88 y NF κ B, por ejemplo, la proteína se dirige a un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, o el ARNm transcrito a partir del gen relevante es inhibido por un mecanismo, tal como ARNi.

En una realización, la diana es HSp70 o un regulador de la supervivencia y muerte celular, tal como la survivina, por ejemplo, la proteína se dirige a un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, o el ARNm transcrito del gen relevante es inhibido por un mecanismo, tal como RNAi.

- 40 En una realización, la diana es una o más seleccionadas independientemente del grupo que comprende: ampiegulina, BTC, NRG1a, NRG1b, NRG3, TGF α , LRIG1, LRIG3, EGF, EGF-L6, Epigen, HB-EGF, EGFR, Her2, Her3 y Her4, por ejemplo, la proteína se dirige a un inhibidor, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, o el ARNm transcrito del gen relevante se inhibe mediante un mecanismo, tal como ARNi.

En una realización, la diana es un ligando o receptor para uno o más seleccionados independientemente del grupo que comprende: hedgehog, FGF, IGF, Wnt, VEGF, TNF, TGF β , PDGF y Notch.

- 45 En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para VEGF. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo anti-VEGF. Por ejemplo, tal como un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo Bevacizumab o equivalente a la misma. En una realización, el adenovirus expresa un anticuerpo VEGF antihumano de longitud completa. En una realización, la expresión del anticuerpo de VEGF antihumano de longitud completa está bajo el control de un promotor endógeno, tal como el promotor tardío principal (MLP), en particular en la posición By. En una realización, el adenovirus expresa la forma scFv del anticuerpo VEGF anti-humano. En una realización, la expresión de la forma scFv del anticuerpo VEGF anti-humano está bajo el control de un promotor endógeno, tal como el promotor tardío principal, en particular, en la posición By. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena VH del anticuerpo anti-VEGF es la SEQ ID NO: 29. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada constante del anticuerpo anti-VEGF es la SEQ ID

NO: 33 ó 34. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena VL del anticuerpo anti-VEGF es la SEQ ID NO: 31. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera constante del anticuerpo anti-VEGF es la SEQ ID NO: 35. En una realización, la secuencia de aminoácidos del fragmento de anticuerpo anti-VEGF scFv es la SEQ ID NO: 36.

5 En una realización, la diana es IDO.

En una realización, la diana es un antígeno para el reconocimiento por parte de las células inmunitarias de una o más proteínas o péptidos seleccionados independientemente del grupo que comprende: proteínas inmunogénicas de organismos infecciosos, tales como antígenos de citomegalovirus, antígenos de influenza, antígenos de superficie y núcleo de hepatitis B, toxoide diftérico, Crm197, toxoide tetánico; péptidos derivados de tales antígenos que son epítomos conocidos de células T o anticuerpos, o compuestos genéticamente modificados o multímeros de tales antígenos; proteínas derivadas de tumores como antígenos; péptidos derivados de tales antígenos que son epítomos conocidos de células T o anticuerpos; y compuestos genéticamente modificados o multímeros de tales antígenos, por ejemplo, WT1, MUC1, LMP2, idiotipo, VPH E6 & E7, EGFRvIII, HER-2/neu, MAGE A3, p53 no mutante, p53 mutante, NY-ESO-1, GD2, PSMA, PCSA, PSA, gp100, CEA, MelanA/MART1, Ras mutante, proteinasa3 (PR1), bcr-abl, tirosinasa, survivina, PSA, hTERT, particularmente WT1, MUC1, HER-2/neu, NY-ESO-1, survivina o hTERT.

Los expertos apreciarán que existen muchas posibilidades para las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos dada debido a la redundancia de los codones, que toleran mutaciones de pares de bases de ácidos nucleicos silenciosas y todas las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos dada como se define en cualquiera de las SEQ ID NO que se prevén por la presente descripción.

En una realización, el péptido, polipéptido o proteína codificada por un transgén es un mimotopo. Como se emplea en la presente, un mimotopo es una molécula, a menudo un péptido, que imita la estructura de un epítipo. La última propiedad causa una respuesta de los anticuerpos similar a la provocada por el epítipo. Un anticuerpo para un antígeno epitópico dado reconocerá un mimotopo que imitará ese epítipo. Los mimótopos se obtienen comúnmente a partir de bibliotecas de presentación de fagos mediante un proceso de purificación por afinidad denominado *Biopanning*. Se están desarrollando vacunas que utilizan mimótopos. Por tanto, pueden usarse anticuerpos de especificidad conocida para explorar bibliotecas (por ejemplo, bibliotecas de péptidos en presentación de fagos, por ejemplo, bibliotecas de secuencias de Ab o bibliotecas de péptidos no anticuerpos, particularmente aquellas optimizadas para producir péptidos con conformaciones 3D más estables) - La generación de mimótopos está bien descrita en la técnica (véase Tribbick G, Rodda S., Combinatorial methods for discovery of peptide ligands which bind to antibody-like molecules, *J Mol Recognit.* 2002 15(5): 306-10; Masuko T, Ohno Y, Masuko K, Yagi H, Uejima S, Takechi M, Hashimoto Y. Towards therapeutic antibodies to membrane oncoproteins by a robust strategy using rats immunized with transfectants expressing target molecules fused to green fluorescent protein. *Cancer Sci.* 2011 102(1):25-35).

En una realización, un mimótopo u otros antígenos de vacuna diseñados se codifican por un transgén y se expresan con el fin de inducir una respuesta de anticuerpos en el paciente receptor, en donde los anticuerpos inducidos tienen el efecto terapéutico deseado. En una realización, se usan proteínas de fusión GFP-péptido, con secuencias peptídicas del ligando humano deseado, para inducir respuestas de anti-auto anticuerpos dianas, por ejemplo, una región peptídica de PD-L1 que se sabe que es importante para unirse a la molécula diana PD-1 puede estar genéticamente unida a GFP u otras proteínas portadoras ajenas altamente inmunogénicas de modo que una respuesta de anticuerpos inmunes al péptido incluya anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con la molécula PDL1 nativa y así bloqueen las interacciones PD-L1:PD-1 en la misma forma en que codificarían directamente un anticuerpo anti-PDL1. Los conceptos para las vacunas que inducen respuestas de anti-auto anticuerpos terapéuticos están bien descritos en la técnica (véase Spohn G, Bachmann MF. Therapeutic vaccination to block receptor-ligand interactions. *Expert Opin Biol Ther.* 2003 3(3): 469-76; Link A, Bachmann MF. Immunodrugs: breaking B- but not T-cell tolerance with therapeutic anticytokine vaccines. *Immunotherapy* 2010 2(4): 561-74; Delavallée L, Assier E, Semerano L, Bessis N, Boissier MC. Emerging applications of anticytokine vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2008 7(10):1507-17).

En una o más realizaciones, el transgén empleado codifica una secuencia mostrada en cualquiera de las SEQ ID NO: 29 a 44, 67 y 70-71.

Ventajosamente, los adenovirus de la presente descripción expresan y liberan formas de anticuerpos y otras proteínas, tales como citoquinas codificadas por un transgén en el interior del sobrenadante del cultivo in vitro o en el estroma tisular tumoral in vivo (véanse las figuras 4-8, 11-12, 16-19, 28 - 29, 33, 35, 38 - 40, 42 - 43, 47, 49, 51).

Las secuencias líder pueden ayudar a las proteínas codificadas/polipéptido o péptido que sale de la célula cancerosa. Por lo tanto, en una realización, la "proteína" codificada comprende una secuencia líder. La secuencia líder, como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia de polinucleótidos localizada entre la secuencia promotora y la región codificante que puede regular la expresión génica a nivel de transcripción o traducción.

5 En una realización, la secuencia codificante codifica un péptido. El péptido, tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una cadena de aminoácidos que no es una proteína funcional completa. Típicamente es un fragmento que conserva parte o la totalidad de la función de la proteína de la que es un fragmento, o puede ser reconocida por el sistema inmune, por ejemplo, péptidos de 8 o más aminoácidos que pueden ser reconocidos por las células T.

En una realización, el transgén es un gen indicador que codifica, por ejemplo, un agente de formación de imágenes que incluye agentes de formación de imágenes fluorescentes y bioluminiscentes (que incluyen agentes de formación de imágenes fluorescentes activables), tales como luciferasa, GFP o eGFP o proteína fluorescente roja.

10 El gen indicador o secuencia indicadora, como se emplea en la presente memoria, significa un gen o secuencia de ADN que produce un producto fácilmente detectable en células eucariotas y puede usarse como un marcador para determinar la actividad de otro gen con el que su ADN se ha unido o combinado estrechamente. Los genes indicadores confieren características a las células u organismos que las expresan que se identifican y miden fácilmente, o son marcadores seleccionables. Los genes indicadores a menudo se utilizan como una indicación de si un determinado gen ha sido absorbido o expresado en la población de células u organismos. Los ejemplos de genes
15 indicadores comunes incluyen, pero sin limitación, LacZ, luciferasa, GFP, eGFP, neomicina fosfotransferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, simportador de yoduro de sodio (NIS), nitrorreductasa (p. ej. NfsA, NfsB) metaloproteínas intracelulares, HSV1-tk o receptor de estrógenos.

En una realización, el material genético (en particular, el transgén) no codifica ni expresa un gen indicador, tal como un agente de formación de imágenes, luciferasa, GFP o eGFP.

20 En una realización, la secuencia de aminoácidos de NIS es la SEQ ID NO: 67

Los virus de acuerdo con la presente descripción pueden investigarse por su preferencia para un tipo de tumor específico mediante el examen de su potencial lítico en un panel de células tumorales, por ejemplo, las líneas celulares tumorales de colon incluyen HT-29, DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 y Colo320DM. Cualquier línea celular tumoral de colon disponible sería igualmente útil para dicha evaluación.

25 Las líneas celulares de próstata incluyen las células DU145 y PC-3. Las líneas celulares pancreáticas incluyen las células Panc-1. Las líneas celulares de tumor de mama incluyen la línea celular MDA231 y las líneas celulares ováricas incluyen la línea celular OVCAR-3. Las líneas celulares hematopoyéticas incluyen, entre otras, las células B-linfoideas Raji y Daudi, las células eritroblastoides K562, las células mieloides U937 y las células T-linfoideas HSB2. Otras líneas de células tumorales disponibles son igualmente útiles.

30 La presente descripción también se extiende a nuevas secuencias descritas en este documento. En una realización, el virus se muestra en cualquiera de las secuencias descritas en este documento, por ejemplo, SEQ ID NOS: 1 a 9, SEQ ID NOS: 48-53, SEQ ID NO: 56-63, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68-69 y SEQ ID NO: 72-73.

Formulaciones

35 La presente descripción se refiere también a una formulación farmacéutica de un virus como se describe en este documento.

En una realización, se proporciona una formulación parenteral líquida, por ejemplo, para infusión o inyección, de una oncolítica capaz de replicación de acuerdo con la presente descripción en la que la formulación proporciona una dosis en el intervalo de 1×10^{10} a 1×10^{14} partículas virales por volumen de dosis.

40 La formulación parenteral significa una formulación diseñada para no administrarse a través del tracto GI. Las vías de administración parenteral típicas incluyen la inyección, implantación o infusión. En una realización, la formulación se proporciona en una forma para su administración en bolo.

45 En una realización, la formulación parenteral está en forma de una inyección. La inyección incluye la inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intramuscular. La inyección, tal como se emplea en la presente memoria, significa la inserción de líquido en el cuerpo a través de una jeringa. En una realización, el método de la presente descripción no implica la inyección intratumoral.

En una realización, la formulación parenteral está en forma de una infusión.

50 La infusión, tal como se emplea en la presente memoria, significa la administración de fluidos a una velocidad más lenta por goteo, bomba de infusión, impulsor de jeringa o dispositivo equivalente. En una realización, la infusión se administra durante un período en el intervalo de 1,5 minutos a 120 minutos, tal como aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 ó 115 minutos.

En una realización, una dosis de la formulación es menos de 100 ml, por ejemplo 30 ml, tal como la administrada por un impulsor de jeringa.

En una realización, la inyección se administra como una inyección lenta, por ejemplo, durante un período de 1,5 a 30 minutos.

5 En una realización, la formulación es para la administración intravenosa (i.v.). Esta ruta es particularmente efectiva para la administración del virus oncolítico porque permite un acceso rápido a la mayoría de los órganos y tejidos y es particularmente útil para el tratamiento de la metástasis, por ejemplo, metástasis establecidas, especialmente aquellas ubicadas en regiones altamente vascularizadas, tales como el hígado y los pulmones.

10 Las formulaciones terapéuticas típicamente serán estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra formulación parenteral adecuada para la administración a un ser humano y se puede formular como un dispositivo precargado tal como una jeringa o vial, en particular, como una dosis única.

La formulación generalmente comprenderá un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un vehículo isotónico no tóxico que sea compatible con el virus, y en el que el virus sea estable durante el período de tiempo requerido.

15 El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un dispersante o tensioactivo, tal como lecitina o un tensioactivo no iónico, tal como el polisorbato 80 ó 40. En las dispersiones, el mantenimiento del tamaño de partícula requerido puede ser asistido por la presencia de un tensioactivo. Los ejemplos de agentes isotónicos incluyen azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

20 En una realización, las formulaciones parenterales empleadas pueden comprender uno o más de los siguientes tampones, por ejemplo, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico, un tampón de fosfato y/o un tampón Tris, un azúcar, por ejemplo, dextrosa, manosa, sacarosa o similar, una sal, tal como el cloruro de sodio, cloruro de magnesio o cloruro de potasio, un detergente, tal como un tensioactivo no iónico tal como brij, PS-80, PS-40 o similares. La formulación también puede comprender un conservante tal como EDTA o etanol o una combinación de
25 EDTA y etanol, que se cree que previenen una o más rutas de posible degradación.

En una realización, la formulación comprenderá un virus oncolítico purificado de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, de 1×10^{10} hasta 1×10^{14} partículas virales por dosis, tal como de 1×10^{10} hasta 1×10^{12} partículas virales por dosis. En una realización, la concentración de virus en la formulación está en el intervalo de 2×10^8 a 2×10^{14} vp/ml, tal como 2×10^{12} vp/ml.

30 En una realización, la formulación parenteral comprende glicerol.

En una realización, la formulación comprende un adenovirus oncolítico como se describe en la presente memoria, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico), glicerol y tampón.

35 En una realización, la formulación parenteral consiste en el virus de la descripción, HEPES, por ejemplo, 5 mM, glicerol, por ejemplo, al 5-20% (v/v), ácido clorhídrico, por ejemplo, para ajustar el pH en el intervalo 7-8 y agua para inyección.

En una realización, se formulan 0,7 ml del virus de la invención a una concentración de 2×10^{12} vp/ml en HEPES 5 mM, glicerol al 20% con un pH final de 7,8.

Una discusión completa de los vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

40 En una realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas que incluyen la inhalación.

45 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propelentes o soluciones inhalables libres de gases propelentes. Los polvos para inhalar de acuerdo con la descripción generalmente contendrán un virus, como se describe en este documento, con un excipiente fisiológicamente aceptable.

50 Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan de manera adecuada mono- o di-sacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente, pero no exclusivamente, en la forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula inferior a 10 micras, tal como 1-9 micras, por ejemplo, de 0,1 a 5 μm , en particular, de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula del vehículo del virus es de importancia primaria y así, en una realización, el virus de acuerdo con la presente descripción puede adsorberse o absorberse sobre una partícula, tal como una partícula de lactosa del tamaño dado.

Los gases propelentes que pueden usarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propelentes mencionados anteriormente pueden usarse solos o en mezclas de los mismos.

- 5 Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcanos halogenados seleccionados entre TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados antes mencionados, son particularmente adecuados TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de los mismos.

- 10 Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes también pueden contener otros ingredientes, tales como codisolventes, estabilizadores, agentes tensioactivos (tensioactivos), antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propelentes según la invención pueden contener hasta 5% en peso de la sustancia activa. Los aerosoles según la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5% en peso, de 0,01 a 3% en peso, de 0,015 a 2% en peso, de 0,1 a 2% en peso, de 0,5 a 2% en peso o de 0,5 a 1% en peso del ingrediente activo.

- 15 Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden hacerse mediante la administración de una solución líquida o formulación de suspensión, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus(R) conectado a un compresor Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

- 20 El virus de la invención puede administrarse disperso en un disolvente, p. ej. en forma de una solución o una suspensión, por ejemplo, como ya se ha descrito anteriormente para formulaciones parenterales. Se puede suspender en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, una solución salina u otro disolvente farmacológicamente aceptable o una solución tamponada. Las soluciones tamponadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 mg a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato sódico por 1 ml de agua para alcanzar un pH de aproximadamente 4,0 a 5,0.

- 25 Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen tampones (por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (p. ej., albúmina sérica), EDTA, cloruro sódico, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente se proporcionará en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y la esterilización por filtración del disolvente/solución tamponada utilizada para la formulación, la suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de disolvente tamponado estéril y la dispensación de la formulación en receptáculos estériles por métodos familiares para los expertos en la técnica.

- 35 La formulación nebulizable de acuerdo con la presente descripción se puede proporcionar, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, recipientes o viales de plástico sellados) empaquetados en sobres de papel. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de disolvente/solución tampón.

Tratamiento

- 40 En un aspecto adicional, la presente descripción se extiende a un virus o a una formulación del mismo, como se describe en este documento, para su uso en tratamientos, en particular, para el tratamiento del cáncer.

En una realización, el método de tratamiento es para su uso en el tratamiento de un tumor.

El tumor, tal como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a una masa anormal de tejido que resulta de una división celular excesiva que no está controlada y es progresiva, también denominada neoplasia. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos. El tumor abarca todas las formas de cáncer y metástasis.

- 45 En una realización, el tumor es un tumor sólido. El tumor sólido puede estar localizado o en metástasis.

En una realización, el tumor es de origen epitelial.

En una realización, el tumor es una malignidad, tal como cáncer colorrectal, hepatoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de pulmón.

- 50 En una realización, el tumor es una neoplasia maligna colorrectal.

La malignidad, tal como se emplea en este documento, significa células cancerosas.

En una realización, el adenovirus oncolítico se emplea en el tratamiento o la prevención de la metástasis.

En una realización, el método o la formulación en este documento se emplean en el tratamiento de cánceres resistentes a fármacos.

5 En una realización, el virus se administra en combinación con la administración de un tratamiento o terapia adicional contra el cáncer.

En una realización, se proporciona un virus o formulación de acuerdo con la presente descripción para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, un cáncer como el descrito anteriormente.

10 En un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus o formulación de acuerdo con la presente descripción a un paciente que lo necesita, por ejemplo, un paciente humano.

En una realización, el virus o formulación oncolítica de la presente se administra en combinación con otra terapia.

"En combinación", tal como se emplea en la presente, pretende abarcar el lugar donde se administra el virus oncolítico antes, simultáneo y/o posterior al tratamiento o la terapia del cáncer.

15 La terapia del cáncer incluye cirugía, radioterapia, terapia dirigida y/o quimioterapia. El tratamiento del cáncer, como se emplea en la presente memoria, se refiere al tratamiento con un compuesto terapéutico o agente biológico, por ejemplo, un anticuerpo destinado a tratar el cáncer y/o la terapia de mantenimiento del mismo.

20 En una realización, el tratamiento del cáncer se selecciona de cualquier otra terapia contra el cáncer que incluye un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico dirigido, radioterapia, terapia con radioisótopos o cualquier combinación de los mismos.

25 En una realización, el virus de la presente descripción, tal como un adenovirus oncolítico, se puede usar como un pretratamiento de la terapia, tal como una cirugía (terapia neoadyuvante), para reducir el tamaño del tumor, tratar la metástasis y/o prevenir la metástasis o metástasis adicionales. El adenovirus oncolítico se puede usar después de alguna terapia, tal como una cirugía (terapia adyuvante), para tratar la metástasis y/o prevenir la metástasis o metástasis adicionales.

Al mismo tiempo, tal como se emplea en este documento, está la administración del tratamiento adicional contra el cáncer al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo que la formulación del adenovirus oncolítico. El tratamiento puede estar contenido dentro de la misma formulación o ser administrado como una formulación separada.

30 En una realización, el virus se administra en combinación con la administración de un agente quimioterapéutico.

35 El agente quimioterapéutico, como se emplea en la presente memoria, pretende referirse a agentes químicos antineoplásicos específicos o fármacos que son selectivamente destructivos para células y tejidos malignos. Por ejemplo, agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides de plantas, inhibidores de topoisomerasa y otros agentes antitumorales. Otros ejemplos de quimioterapias incluyen doxorubicina, 5-fluorouracilo (5-FU), paclitaxel, capecitabina, irinotecán y platina, tal como cisplatino y oxaliplatino. La dosis preferida puede ser elegida por el médico en función de la naturaleza del cáncer que se trate.

En una realización, el agente terapéutico es el ganciclovir, que puede ayudar a controlar la respuesta inmune y/o la vascularización del tumor.

40 En una realización, una o más terapias empleadas en el método de la presente memoria son metronómicas, es decir, un tratamiento continuo o frecuente con dosis bajas de fármacos anticancerosos, a menudo administradas concomitantemente con otros métodos de terapia.

45 Adenovirus oncolíticos del subgrupo B, en particular Ad11 y los derivados de los mismos, tales como EnAd pueden ser particularmente sinérgicos con los agentes quimioterapéuticos porque parecen tener un mecanismo de acción que es, en gran medida, independiente de la apoptosis, matando las células cancerosas mediante un mecanismo predominantemente necrolítico. Además, la inmunosupresión que se produce durante la quimioterapia puede permitir que el virus oncolítico funcione con mayor eficacia.

50 La dosis terapéutica, como se emplea en la presente memoria, se refiere a la cantidad de virus, tal como un adenovirus oncolítico que es adecuado para lograr el efecto terapéutico deseado cuando se emplea en un régimen de tratamiento adecuado, por ejemplo, mejora los síntomas o las condiciones de una enfermedad. Una dosis puede considerarse una dosis terapéutica en el tratamiento del cáncer o la metástasis cuando la cantidad de partículas virales puede ser suficiente para provocar lo siguiente: el crecimiento tumoral o metastásico se ralentiza o se detiene, o el tumor o la metástasis se reduce de tamaño, y/o la vida útil del paciente se extiende. Las dosis terapéuticas adecuadas son generalmente un equilibrio entre el efecto terapéutico y la toxicidad tolerable, por

ejemplo, cuando el efecto secundario y la toxicidad son tolerables dado el beneficio logrado por la terapia.

En una realización, se administra un virus o constructo terapéutico según la presente descripción (que incluye una formulación que comprende el mismo) semanalmente, por ejemplo, una semana 1 la dosis se administra el día 1, 3, 5, seguido de una dosis cada semana subsiguiente.

5 En una realización, el virus o constructo terapéutico, según la presente descripción (que incluye una formulación que comprende el mismo), se administra quincenalmente o trisemanalmente, por ejemplo, se administra en la semana 1 en los días 1, 3 y 5, y en la semana 2 ó 3 también se administra los días 1, 3 y 5 de la misma. Este régimen de dosificación puede repetirse tantas veces como sea apropiado.

10 En una realización, el virus o constructo terapéutico de acuerdo con la presente descripción (que incluye una formulación que comprende el mismo) se administra mensualmente.

15 En una realización, los virus y construcciones de la presente descripción se preparan mediante técnicas recombinantes. Las personas expertas apreciarán que el genoma de adenovirus armado se puede fabricar por otros medios técnicos, que incluyen sintetizar completamente el genoma o un plásmido que comprende parte de todo el genoma. El experto en la materia apreciará que, en el caso de sintetizar el genoma, la región de inserción puede no comprender los nucleótidos del sitio de restricción ya que estos últimos son artefactos después de la inserción de genes utilizando métodos de clonación.

En una realización, el genoma de adenovirus armado se fabrica de forma completamente sintética, por ejemplo, según SEQ ID NO: 63.

20 La descripción en el presente documento se extiende además a un adenovirus de fórmula (I) o a una subfórmula del mismo, obtenida u obtenible a partir de la inserción de un transgen o casete transgénico.

"Es" como se emplea en este documento significa que comprende.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "que comprende" se debe interpretar como "que incluye".

25 Las realizaciones de la invención que comprenden ciertas características/elementos también pretenden extenderse a realizaciones alternativas "que consisten" o "que consisten esencialmente" en los elementos/características relevantes.

Cuando sea técnicamente apropiado, las realizaciones de la invención se pueden combinar.

Cualquier realización específica y explícitamente enumerada en este documento puede formar la base de un aviso legal, ya sea sola o en combinación con una o más realizaciones adicionales.

30 La presente invención se describe adicionalmente a modo de ilustración solo en los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras adjuntas, en las que:

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la transfección y amplificación de partículas de virus NG-135 en células HEK293 después de la transfección con el genoma del virus NG-135.

35 Las células HEK293 se transfectaron con ADN genómico de NG-135 purificado y se monitorizaron para la producción de virus por observación del efecto citopático (CPE). Las imágenes de microscopía (A-E) muestran CPE, caracterizada por la formación de placa en la monocapa celular, que se pudo observar desde 144 horas después de la transfección, el virus se recolectó 216 horas después de la infección (E).

El virus recogido se amplificó en células HEK293, se recogió cuando se observó CPE después de 72 horas (F-G) y luego se amplificó por segunda vez, reuniéndolo cuando se observó CPE después de 48 horas (H-I).

40 La Figura 2 muestra la transfección y amplificación de partículas de virus NG-74 en células HEK293 después de la transfección con el genoma del virus NG-74.

45 Las células HEK293 se transfectaron con ADN genómico de NG-74 purificado y se monitorizaron para la producción de virus por observación del efecto citopático (ECP). Las imágenes de microscopía (A-J) muestran CPE, que se caracteriza por la formación de placa en la monocapa celular y se pudo observar a partir de 336 h después de la transfección, el virus se recuperó 384 h después de la infección (J). El virus recuperado se amplificó en células HEK293 (K-R), recuperándolo cuando se observó CPE después de 240 horas (R) y luego se amplificó la segunda (S-V), tercera (W-X), cuarta (Y-Z) y quinta (@) recuperación cuando se observó un CPE significativo.

La Figura 3 muestra la transfección y amplificación de partículas del virus NG-73 en células HEK293 después de la transfección con el genoma del virus NG-73.

50 Las células HEK293 se transfectaron con ADN genómico de NG-73 purificado y se monitorizaron para la producción

- del virus por observación del efecto citopático (CPE). Las imágenes de microscopía (A-G) muestran CPE, caracterizado por la formación de placa en la monocapa celular, se pudo observar a partir de 144 h después de la transfección, el virus se recogió 192 h después de la infección. El virus recuperado se amplificó en células HEK293 (H) y luego se amplificó una segunda (I-L) y una tercera vez (M), recuperándolo cuando se observó un CPE significativo.
- 5 La Figura 4 muestra la detección por ELISA del anticuerpo anti-VEGF secretado a partir de células HEK293 infectadas con NG-135.
- Las células HEK293 se infectaron in vitro durante 72 horas con un virus de control, NG-47, o un virus que expresaba anticuerpos anti-VEGF, NG-135. Los niveles de anticuerpo IgG1 humano anti-VEGF en sobrenadantes de cultivo se midieron mediante ELISA usando placas recubiertas con VEGF humano y un anticuerpo de detección IgG-Fc anti-humano (A). Los niveles de anticuerpos se cuantificaron usando una curva estándar del anticuerpo humano anti-VEGF purificado, bevacizumab (B).
- 10 La Figura 5 muestra la detección por transferencia Western del anticuerpo anti-VEGF secretado a partir de células HEK293 infectadas con NG-135.
- 15 Las células HEK293 se infectaron in vitro durante 24 horas con el virus que expresa el anticuerpo anti-VEGF, NG-135. El anticuerpo IgG1 humano anti-VEGF en sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante transferencia Western con un anticuerpo de detección de IgG anti-humano.
- La Figura 6 muestra la curva estándar del anticuerpo humano anti-VEGF purificado, bevacizumab. El anticuerpo anti-VEGF humano purificado, bevacizumab, se diluyó en serie y se cuantificó mediante ELISA usando placas recubiertas con VEGF humano. Esto determinó las concentraciones requeridas para la producción de una curva estándar de bevacizumab para su uso en ELISA.
- 20 La Figura 7 muestra la detección por inmunotransferencia de tipo Western de ScFv anti-VEGF secretado a partir de células HEK293 infectadas con NG-76.
- 25 Las células HEK293 se infectaron con el virus NG-76, se cultivaron durante 24 ó 44 horas y luego se evaluó la expresión de ScFv anti-VEGF mediante transferencia Western usando un anticuerpo marcador anti-His para detectar el producto ScFv codificado.
- La Figura 8 muestra la detección de inmunotransferencia de tipo Western de ScFv anti-VEGF secretada a partir de células de carcinoma de colon infectadas con NG-76 o NG-78.
- 30 Las células de carcinoma de colon HT-29 se infectaron con los virus EnAd, NG-76 o NG-78, se cultivaron durante 22, 46 ó 70 horas y luego se evaluó la expresión de ScFv anti-VEGF mediante transferencia de Western usando un anticuerpo marcador anti-His para detectar el producto codificado ScFv (A).
- La Figura 9 muestra la replicación del virus NG-76 48 horas después de la infección en células HT-29. Se infectaron células de carcinoma de colon HT-29 con 10 ó 1 partículas del virus NG-76 por célula (ppc), se cultivaron durante 48 horas y luego se evaluó la expresión del genoma del virus mediante qPCR.
- 35 La Figura 10 muestra esquemas que describen la construcción de casetes de transgenes de anticuerpos anti-VEGF. Las secuencias para las versiones completas (cadenas pesadas y ligeras) o ScFv de los anticuerpos anti-VEGF se insertaron en el genoma EnAd2.4 entre los sitios de restricción Sbf y Sgf localizados corriente abajo del gen del virus L5 (Fibra).
- La Figura 11 muestra la replicación del virus NG-135 y la expresión génica es comparable a EnAd en líneas celulares de carcinoma de colon. Las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29 y DLD se infectaron in vitro con EnAd o NG-135 y se cultivaron durante 3 días. Fueron evaluadas la replicación del virus (medida por la cuantificación del ADN viral usando qPCR) y la expresión del gen del virus (hexón) (medida por la cuantificación del ARN viral usando RTqPCR). Se obtuvieron datos comparables con ambos virus (A & B).
- 40 La Figura 12 muestra la expresión del gen del anticuerpo anti-VEGF detectable en líneas celulares de carcinoma de colon infectado con NG-135. Las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29 y DLD se infectaron in vitro con EnAd o NG-135, se cultivaron durante 3 días y luego se evaluó la expresión del anticuerpo anti-VEGF mediante RTqPCR del ARN de las células.
- 45 La Figura 13 muestra que el anticuerpo anti-VEGF está presente en los sobrenadantes de líneas celulares de carcinoma de colon infectadas con NG-135 y puede unirse a hVEGF-165. Las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29, DLD y HCT-116 se infectaron in vitro con EnAd o NG-135, se cultivaron durante 3 días. Los niveles de anticuerpo de IgG1 humano anti-VEGF en sobrenadantes de cultivo se midieron mediante ELISA usando placas recubiertas con VEGF humano y un anticuerpo de detección IgG-Fc anti-humano. Los niveles de anticuerpos se cuantificaron usando una curva estándar del anticuerpo humano anti-VEGF purificado, bevacizumab.
- 50 La Figura 14 muestra que el ScFv anti-VEGF está presente en los sobrenadantes de líneas celulares de carcinoma

de colon infectadas con NG-76 y puede unirse a hVEGF-165. Las células de carcinoma de colon HT-29 se infectaron con los virus EnAd, NG-76 o NG-78, se cultivaron durante 22, 46 ó 70 horas y luego se evaluó la expresión de ScFv anti-VEGF mediante transferencia de Western usando un marcador anti-His para detectar el producto codificado ScFv (A).

- 5 La expresión de ScFv en células de riñón embrionario humano se evaluó mediante ELISA de unión a VEGF. La especificidad del ScFv expresado para VEGF se confirmó por la inhibición de la unión de VEGF incluyendo una baja concentración del anticuerpo humano anti-VEGF purificado, bevacizumab, en el ELISA (B).

Figura 15. La replicación del virus NG-135 es comparable a EnAd en un modelo de xenoinjerto subcutáneo implantado con células DLD. Se implantaron células de carcinoma de colon humano DLD como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y los tumores establecidos se inyectaron con 5×10^9 partículas de virus EnAd o NG-135. La replicación del virus en los tumores se evaluó los días 3, 7 (A, n = 4 por punto de tiempo) o el día 28 después de la infección (B, n = 10) por qPCR.

La Figura 16 muestra la expresión del gen del anticuerpo anti-VEGF que se detecta en un modelo de tumor DLD subcutáneo tratado con NG-135. Se implantaron células de carcinoma de colon humano DLD como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y los tumores establecidos se inyectaron con 5×10^9 partículas de virus EnAd o NG-135. El gen hexón del virus (A) y la expresión del gen de la cadena pesada del anticuerpo anti-VEGF codificada (B) (ARNm) se evaluaron mediante RTqPCR del ARN del tejido tumoral los días 3 y 7 posteriores al tratamiento.

La Figura 17 muestra que el anticuerpo anti-VEGF se expresa en un modelo de tumor DLD subcutáneo tratado con NG-135. Las células de carcinoma de colon humano DLD se implantaron como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y los tumores establecidos se inyectaron con 5×10^9 EnAd (n = 4) o NG-135 (n = 8) partículas de virus. Los tumores se escindieron el día 28 después de la infección, los extractos homogéneos y solubles se evaluaron para determinar el contenido total de IgG1 humana (A) y el anticuerpo anti-VEGF (B) mediante ELISA. Los extractos de uno de los tumores EnAd se enriquecieron con 8 ng/ml de anticuerpo anti-VEGF humano (bevacizumab) como control positivo en cada ELISA.

Figura 18. La infección por NG-135 de un modelo de xenoinjerto subcutáneo muestra la expresión del anticuerpo anti-VEGF y la replicación del virus en tumores HCT-116.

Las células de carcinoma de colon humano HCT-116 se implantaron como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y los tumores establecidos se inyectaron con 5×10^9 partículas de virus EnAd o NG-135. Los tumores se extirparon los días 3, 7 y 14 (n = 5 por punto de tiempo). La replicación del virus se evaluó mediante qPCR (A) y la expresión en el tejido del anticuerpo anti-VEGF (IgG1 humana) se determinó mediante ELISA de IgG humana (B).

Figura 19. El anticuerpo anti-VEGF puede detectarse en la circulación periférica 28 días después del tratamiento con NG-135 en un modelo de tumor de xenoinjerto. Las células de carcinoma de colon humano DLD se implantaron como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y al tumor establecido se inyectó con 5×10^9 partículas del virus EnAd o NG-135. Los niveles del anticuerpo anti-VEGF en la circulación periférica de los ratones portadores de tumor se evaluaron mediante ensayos ELISA de IgG1 humana. La absorbancia sustraída de fondo a 450 nm se muestra en (A) y la concentración de anticuerpo anti-VEGF se cuantificó usando una curva estándar del anticuerpo VEGF anti-humano purificado, bevacizumab (B).

La Figura 20 muestra elementos esquemáticos de ejemplo que pueden estar presentes en el casete transgénico.

La Figura 21 muestra elementos esquemáticos de ejemplo codificados en casetes transgénicos.

La Figura 22 muestra esquemas de casetes de transgenes que codifican genes indicadores.

La Figura 23 muestra esquemas de casetes de transgenes que codifican citocinas.

La Figura 24 muestra esquemas de casetes de transgenes que codifican anticuerpos o dominios de anticuerpos.

La Figura 25 muestra la replicación del virus y la expresión de la proteína indicadora funcional en líneas celulares de carcinoma de colon infectadas con los virus NG-47 y NG-61. Las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29 se infectaron durante 24, 48, 72 ó 96 horas con EnAd o los virus NG-47 o NG-61, que expresan las proteínas indicadoras GFP o luciferasa, respectivamente. La replicación del virus se evaluó mediante qPCR en cada punto de tiempo y fue comparable a EnAd (A-B). La expresión de GFP se evaluó por el nivel de fluorescencia detectable en lisados celulares (C).

La Figura 26 muestra que la potencia oncolítica del virus NG-47 y NG-61 es comparable a EnAd. Las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29 se infectaron con partículas de virus EnAd, NG-47 o NG-61. 72 horas después se cuantificó la viabilidad celular de la inoculación y se representó en % la supervivencia celular (A-B). Tanto la potencia del virus NG-47 como la de NG-61 fue equivalente a EnAd en líneas celulares HT29 (A-B) y en líneas celulares HT29, WI38 y MRC5 (C).

La Figura 27 muestra la replicación del virus y la expresión transgénica en un panel de virus EnAd que expresan

genes indicadores. Las líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29 se infectaron con EnAd o un panel de virus que expresan GFP bajo un promotor exógeno, CMV, el promotor tardío principal endógeno (MLP) o el promotor E4 endógeno. Después de 24, 48, 72 ó 96 horas, la replicación del virus se evaluó mediante qPCR (A) y la expresión de GFP se cuantificó mediante detección de fluorescencia en un lector de placas (B).

5 La Figura 28 muestra la producción de anticuerpos anti-VEGF en líneas celulares de carcinoma de pulmón y colon infectadas con NG-135. Se infectaron líneas celulares de carcinoma colorrectal humano HT-29 o carcinoma de pulmón A549 durante 24, 48 ó 72 horas con partículas del virus NG-135. En cada momento, la producción de anticuerpos en el sobrenadante celular se evaluó durante 5 minutos, 1 hora o 3 horas mediante ELISA de IgG1 (los datos de HT-29 se muestran en A, los datos de A549 se muestran en B). El cálculo de la cantidad de IgG1 producida por células $1e6$ en 24, 48 ó 72 horas se muestra en la tabla (C).

10 La Figura 29 muestra la producción del virus NG-139 y la expresión de TNF α en líneas celulares de carcinoma de colon infectadas con el virus NG-139. Las células HT-29 se infectaron con el virus NG-139 durante 36 horas antes de evaluar la producción de virus mediante visualización de CPE y tinción para la producción de la proteína de la cápside del virus Hexón por inmunohistoquímica (IHC) (A y B). La producción de TNF α en sobrenadante de células infectadas con NG-139 se evaluó mediante ELISA y se cuantifica en la tabla que se muestra en (C). Se implantaron células de carcinoma de colon humano DLD como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y se trató el tumor establecido en 3 ocasiones con 5×10^9 partículas de virus EnAd o NG-135. Los niveles de TNF en los tumores 15 días después del tratamiento se evaluaron mediante ELISA (D).

La Figura 30 muestra un mapa de la arquitectura del genoma de adenovirus.

20 La Figura 31 muestra la replicación del virus NG-61 el Día 3 y el Día 7 post-tratamiento en un modelo de xenoinjerto subcutáneo implantado con células DLD.

La Figura 32 muestra la expresión del transgén de luciferasa en tumores el Día 7 después del tratamiento en un modelo de xenoinjerto subcutáneo implantado con células DLD.

25 La Figura 33 muestra la replicación del virus NG-135 y la expresión del anticuerpo anti-VEGF en líneas celulares de carcinoma de colon, pulmón y ovario. Se infectaron líneas celulares de carcinoma HT-29, HCT-116, DLD (colon), SKOV (ovario) o A549 (pulmón) con partículas de virus NG-135 o EnAd durante 24-120 h. La replicación del virus se evaluó cada 24 horas mediante qPCR y la replicación máxima a lo largo del curso del tiempo se representó en (A). La producción de anticuerpos anti-VEGF también se midió cada 24 horas mediante IgG1 ELISA y el anticuerpo total secretado en el sobrenadante celular en cada punto de tiempo se muestra en (B).

30 La Figura 34 muestra esquemas de casetes transgénicos que codifican un antígeno asociado a tumor, anticuerpos o dominios de anticuerpos.

35 La Figura 35 muestra la replicación del virus NG-135 y la expresión del anticuerpo anti-VEGF en explantes cultivados ex vivo de tumores de xenoinjerto subcutáneo HCT-116 infectados in vivo mediante dosificación IT. Las células de carcinoma de colon humano HCT-116 se implantaron como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu y el tumor establecido se inyectó con 5×10^9 partículas de virus NG-135. 10 días más tarde, los tumores se extirparon y se analizaron para determinar los niveles del genoma del virus (A) y el anticuerpo anti-VEGF (B) antes o después de 7 días de cultivo ex vivo. Niveles de anticuerpos anti-VEGF en sueros.

40 La Figura 36 muestra la replicación del virus NG-135 y el efecto sobre tejidos tumorales en un modelo de tumor de pulmón de células A549 in vivo en ratones. Las células humanas A549 se inyectaron por vía intravenosa en ratones SCID para formar tumores nodulares en los pulmones. A las 8 semanas, cuando se establecieron los tumores, se inyectaron virus EnAd o NG-135 ($5e9$ partículas) por vía intravenosa y se controlaron los efectos sobre los tumores en diferentes momentos. El régimen de dosificación se muestra en (A). El efecto de NG-135 sobre la carga tumoral en los pulmones (medido por qPCR para el gen humano PTGER2) se muestra para diferentes ratones los días 3 y 25 después de la dosificación en (B). (C) muestra los niveles de genomas del virus (qPCR) correlacionados con los niveles de tumor (qPCR PTGER2 humano). Los pulmones disecados en nódulos tumorales visibles y el tejido pulmonar restante también se evaluaron para determinar los niveles del genoma del virus (D).

45 La Figura 37 muestra la actividad de NG-135 y EnAd en un modelo murino de xenoinjerto ortotópico de cáncer de ovario utilizando células de carcinoma de ovario humano SKOV-3 que expresan establemente luciferasa implantada en ratones CB17-SCID mediante inyección intraperitoneal ($5e6$ células/ratón). 22 días después de la implantación, los ratones se trataron con partículas de virus en PBS (control) o $5e7$ EnAd, NG-135 o NG-78 administradas por inyección intraperitoneal y se controló el crecimiento tumoral como actividad de luciferasa a lo largo del tiempo.

50 La Figura 38 muestra la caracterización del virus NG-135 y del anticuerpo anti-VEGF expresado después de la producción y purificación a escala ampliada del material viral de células HEK293 cultivadas en un biorreactor. NG-135 fue comparable en potencia (A) y replicación (B) a un estándar de virus EnAd, con niveles de anticuerpos cada vez mayores detectados en sobrenadantes de cultivo a lo largo del tiempo (C). La caracterización por Western blot (D) y Biacore (E) del anticuerpo purificado muestra comparabilidad con el anticuerpo anti-VEGF fabricado comercialmente (Avastin).

55

- La Figura 39 muestra la producción y caracterización de los virus EnAd que codifican las cadenas H y L del anticuerpo anti-VEGF unidas por un péptido auto-escindible P2A (NG-165), con datos comparativos para la potencia del virus (A), la replicación (B) y la producción de anticuerpos anti-VEGF para EnAd y NG-135 (C).
- 5 La Figura 40 muestra la caracterización de los virus EnAd NG-76 y NG-78 que codifican anticuerpos anti-VEGF ScFvs bajo el control de promotores endógenos o exógenos. Ambos virus mostraron una potencia oncolítica similar al virus EnAd estándar (A & B). Para NG-78, la actividad de unión directa de ScFv a VEGF, tanto en el sobrenadante como en las fracciones de lisado celular, se muestra en (C), y la competencia para la unión de VEGF por el anticuerpo comercial anti-VEGF (bevacizumab) se muestra en (D).
- 10 La Figura 41 muestra una comparación de la actividad del virus NG-76 con EnAd en ratones portadores de tumores, midiéndose la replicación del virus (A), el ARNm de hexón (B) y el ARNm de ScFv (C).
- La Figura 42 muestra el transcurso del tiempo tanto de la replicación como de la expresión del anticuerpo por NG-135 en células HT-29. El anticuerpo secretado fue detectable a las 72 horas para todas las MOI analizadas, pero el nivel de expresión del anticuerpo depende del MOI de entrada (A). La producción y replicación de anticuerpos a las 24, 48 y 72 horas después de la infección con 1 ó 10 virus ppc se muestran en (B-D).
- 15 La Figura 43 muestra la replicación NG-135 (A), el anticuerpo anti-VEGF (B) y la producción de partículas de virus infecciosas (C) en el carcinoma HT-29 y WI38 y MRC5, células de fibroblastos estromales.
- La Figura 44 muestra la expresión selectiva de un transgen indicador eGFP expresado bajo el control de un promotor exógeno (CMV) (NG-47) mostrado en (B) o el MLP endógeno (NG-107) mostrado en (D) en células dendríticas humanas primarias. La expresión transgénica del indicador eGFP para las células dendríticas expuestas a EnAd se muestra en (A) y para las células control no infectadas se muestra en (C).
- 20 La Figura 45 muestra la expresión del transgén de luciferasa en tumores y la respuesta inmune funcional al transgén, virus o tumor en ratones BALB/c cuando la expresión transgénica estaba bajo el control de un promotor exógeno (CMV) (NG-61) o el promotor de MLP endógeno (NG-63). Los tumores CT-26 cultivados en el flanco de ratones BALB/c inmunológicamente intactos se inyectaron intratumoralmente con cualquiera de los virus y la expresión de luciferasa se controló mediante imágenes luminiscentes en el tiempo (A) y se midieron las respuestas de células T a luciferasa (B), EnAd (C) o antígenos tumorales (D) mediante el ensayo ELISPOT.
- 25 La Figura 46 muestra la potencia oncolítica del virus (A, B) y la replicación (C, D) de los virus que codifican anticuerpos (NG-190) o variantes del anticuerpo ScFv (NG-221) a la proteína PD-L1 del camino del inhibidor del punto de control inmune, con comparación con el virus EnAd como comparador estándar.
- 30 La Figura 47 muestra la caracterización del anticuerpo anti-PD-L1 o la producción de ScFv (A) y actividades de unión al ligando PD-L1 (B, C, D) en sobrenadantes de células HT-29 infectadas con NG190 y NG-221, en comparación con la producción de IgG1 y la unión para NG-165 que produce el anticuerpo IgG1 anti-VEGF como control de especificidad.
- La Figura 48 muestra la actividad funcional del anticuerpo anti-PD-L1 expresado en el sobrenadante de las células A549 infectadas con NG-190 evaluada mediante el grado de activación de las células T en una reacción de linfocitos mixtos, medida como IL-2 en sobrenadantes de cultivo. Se usaron células dendríticas diferenciadas de PBMC de dos donantes diferentes como células estimuladoras con células T CD4 purificadas de un tercer donante. Se compara la potenciación de la respuesta de células T por sobrenadantes de NG-190 con la de un anticuerpo monoclonal anti-PDL1 purificado y sobrenadantes de cultivos de NG-165.
- 35 La Figura 49 muestra la actividad funcional del anticuerpo anti-PD-L1 expresado en el sobrenadante de células 293 infectadas con NG-177 en comparación con NG-135 como control de especificidad de anticuerpo. Ambos virus produjeron niveles de IgG1 similares en células 293 (A). Los sobrenadantes NG-177 inhibieron selectivamente la unión de PD-L1 a su ligando PD1 en comparación con NG-135 (B), y estos mismos sobrenadantes NG-177 pudieron mejorar la producción de IL-2 en un ensayo MLR, con anti-PD-L1 monoclonal purificado como control positivo (C).
- 40 La Figura 50 muestra el análisis FACS de la actividad de unión de PD-L1 celular de sobrenadantes de NG-177 sobre células A549 estimuladas con IFN γ , en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal purificado anti-PD-L1 y sobrenadantes de NG-135.
- 45 La Figura 51 muestra la caracterización del anticuerpo que codifica el virus EnAd para la proteína CTLA-4 (NG-242) de la ruta inhibidora del punto de control inmune. La replicación del virus fue comparable al control EnAd (A). La producción de IgG1 por NG-242 fue comparable a NG-135 (B). La actividad funcional del anticuerpo anti-CTLA4 en sobrenadantes de NG242 se demostró por unión directa del ligando (C), en comparación con los sobrenadantes de control NG-165, así como por la inhibición de la unión recombinante de CTLA4-Fc a su ligando B7-1 (D) en experimentos de ELISA.
- 50 La Figura 52 muestra la caracterización de los virus que codifican el antígeno asociado al tumor TAA, NY-ESO-1 (NG-220). La replicación del virus para NG-220 (A) o NG-217 (B) fue comparable al control EnAd. NY-ESO-1 podría
- 55

ser detectado por Western blot en el lisado de las células infectadas con NG-220 pero no en las células control EnAd (C).

5 La Figura 53 muestra la caracterización del virus EnAd con sitios de restricción únicos insertados en las regiones B_x y B_y del genoma (NG-185). La actividad oncolítica del virus comparada por el ensayo de viabilidad celular (A) y la replicación del virus (B) fue comparable al control EnAd,

La Figura 54 muestra esquemáticos de casetes transgénicos que codifican múltiples ScFvs, shRNAs o la proteína simplotadora de yoduro sódico.

Secuencias

10 SEQ ID NO: 1 Secuencia del genoma del virus NG-77 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene una secuencia aceptora de empalme ramificada 5' (bSA), una secuencia de cadena pesada ab con un líder 5', un IRES, una secuencia de cadena ligera ab con un líder 5' y una secuencia poli (A) 3'.

15 SEQ ID NO: 2 Secuencia del genoma del virus NG-135 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene una secuencia aceptora de empalme corta (SSA) de 5', una secuencia de cadena pesada ab con un líder 5', una secuencia de cadena ligera ab, IRES con la secuencia líder 5' y la secuencia poli (A) 3'.

SEQ ID NO: 3 Una secuencia del genoma del virus que comprende un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene una secuencia de cadena pesada de SSA, ab con el líder 5', un SSA y una secuencia de cadena ligera ab con el líder 5'.

20 SEQ ID NO: 4 Una secuencia del genoma vírico que comprende un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene una secuencia de cadena pesada ab SSA, con el líder 5', una secuencia de cadena ligera ab SSA con el líder 5' y la secuencia 3' poli (A).

25 SEQ ID NO: 5 Secuencia del genoma del virus NG-74 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene una secuencia scSA, anti-VEGF ScSA con el líder 5' y la secuencia 3' poli (A).

SEQ ID NO: 6 Secuencia del genoma del virus NG-78 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF con un marcador His₆ C-terminal, insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene una secuencia bSA, scFv anti-VEGF con la secuencia líder 5' y la secuencia 3' 6 x histidina y una secuencia poli (A).

30 SEQ ID NO: 7 Secuencia del genoma del virus NG-76 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF con un marcador His₆ C-terminal, insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene un promotor CMV, una secuencia ScFv anti-VEGF con la secuencia líder 5' y la secuencia 3' 6 x histidina y una secuencia poli (A).

35 SEQ ID NO: 8 Secuencia del genoma del virus NG-73 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene un promotor de CMV, una secuencia ScFv anti-VEGF con el líder 5' y la secuencia 3' poli (A).

40 SEQ ID NO: 9 Secuencia del genoma del virus NG-134 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B_y. El casete transgénico contiene un promotor de CMV, una secuencia de cadena pesada ab con un líder 5', una secuencia de cadena ligera ab, IRES con un líder 5' y una secuencia de poli (A) 3'.

SEQ ID NO: 10 Secuencia de ADN B_x correspondiente y que incluye 28166-28366 bp del genoma de EnAd.

SEQ ID NO: 11 Secuencia de ADN B_y correspondiente y que incluye 29345-29379 bp del genoma de EnAd.

SEQ ID NO: 12 Genoma de EnAd.

SEQ ID NO: 13 Promotor exógeno de CMV.

45 SEQ ID NO: 14 Promotor exógeno de PGK.

SEQ ID NO: 15 Promotor exógeno de CBA.

SEQ ID NO: 16 Aceptor de empalme corto (SSA). Secuencia nula

SEQ ID NO: 17 Aceptor de empalme (SA).

SEQ ID NO: 18 Aceptor de empalme ramificado (bSA).

ES 2 661 132 T3

- SEQ ID NO: 19 Secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES).
- SEQ ID NO: 20 Secuencia de poliadenilación.
- SEQ ID NO: 21 Secuencia líder (HuVH).
- SEQ ID NO: 22 Secuencia líder (HG3).
- 5 SEQ ID NO: 23 Marcador de histidina.
- SEQ ID NO: 24 Marcador V5.
- SEQ ID NO: 25 Péptido P2A.
- SEQ ID NO: 26 Péptido F2A.
- SEQ ID NO: 27 Péptido E2A.
- 10 SEQ ID NO: 28 Péptido T2A.
- SEQ ID NO: 29 Secuencia de aminoácidos de la cadena VH anti-VEGF ab.
- SEQ ID NO: 30 Secuencia de aminoácidos de la cadena VH del anticuerpo anti-PD-L1.
- SEQ ID NO: 31 Secuencia de aminoácidos de la cadena VL anti-VEGF ab.
- SEQ ID NO: 32 Secuencia de aminoácidos de la cadena VL del anticuerpo anti-PD-L1.
- 15 SEQ ID NO: 33 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada constante de IgG1 humana.
- SEQ ID NO: 34 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada constante modificada con IgG1 humana.
- SEQ ID NO: 35 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera constante kappa humana.
- SEQ ID NO: 36 Secuencia de aminoácidos anti-VEGF ScFv.
- SEQ ID NO: 37 Secuencia de aminoácidos anti-PD-L1 ScFv.
- 20 SEQ ID NO: 38 Secuencia de aminoácidos de la proteína verde fluorescente.
- SEQ ID NO: 39 Secuencia de aminoácidos de luciferasa.
- SEQ ID NO: 40 Secuencia de aminoácidos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) humano.
- SEQ ID NO: 41 Secuencia de aminoácidos del interferón humano gamma (IFN γ).
- SEQ ID NO: 42 Secuencia de aminoácidos del interferón humano alfa (IFN α).
- 25 SEQ ID NO: 43 Secuencia de aminoácidos del cáncer humano/antígeno testicular 1 (NY-ESO-1).
- SEQ ID NO: 44 Secuencia de aminoácidos MUC-1 humana.
- SEQ ID NO: 45 Una secuencia de Kozak. gccacatg (secuencia nula)
- SEQ ID NO: 46 Secuencia del genoma del virus NG-177 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico, que codifica un anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor de CMV, una secuencia de cadena pesada ab con un líder 5', una secuencia de cadena ligera ab, IRES, con un líder 5' y una secuencia de poli (A) 3'.
- 30 SEQ ID NO: 47 Secuencia de ADN correspondiente a la región E2B del genoma de EnAd (10355-5068 bp).
- SEQ ID NO: 48 Secuencia del genoma del virus NG-167 que comprende el genoma de EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF con un marcador His₆ C-terminal, insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia 5' SSA, ScFv anti-VEGF con el líder 5' y una secuencia 3' poli (A).
- 35 SEQ ID NO: 49 Secuencia del genoma del virus NG-95 que comprende un casete transgénico que codifica la citoquina, IFN γ , insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor 5' CMV, una secuencia de ADNc IFN γ y una secuencia 3' poli (A).
- 40 SEQ ID NO: 50 Secuencia del genoma del virus NG-97 que comprende un casete transgénico que codifica la citocina, IFN α , insertada en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor 5' CMV, una secuencia de ADNc IFN α y una secuencia 3' poli (A).

- SEQ ID NO: 51 Secuencia del genoma del virus NG-92 que comprende el genoma de EnAd con un casete transgénico que codifica la citocina, IFN γ , insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia 5' bSA, cDNA de IFN γ y una secuencia 3' poli (A).
- 5 SEQ ID NO: 52 Secuencia del genoma del virus NG-96 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica la citocina, IFN α , insertada en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia 5' bSA, cDNA de IFN α y una secuencia 3' poli (A).
- SEQ ID NO: 53 Secuencia del genoma del virus NG-139 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica la citocina, TNF α , insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia 5' SSA, cDNA de TNF α y una secuencia 3' poli (A).
- 10 SEQ ID NO: 54 Inserto de sitio de restricción (B γ).
- SEQ ID NO: 55 Inserto de sitio de restricción (B χ).
- SEQ ID NO: 56 Secuencia del genoma del virus NG-220 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica el antígeno asociado al tumor, NY-ESO-1, insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor PGK 5', secuencia de ADNc NY-ESO-1 y la secuencia 3' poli (A).
- 15 SEQ ID NO: 57 Secuencia del genoma del virus NG-217 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica el antígeno asociado al tumor, NY-ESO-1, insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor CMV 5', una secuencia ADNc NY-ESO-1 y una secuencia 3' poli (A).
- SEQ ID NO: 58 Secuencia del genoma del virus NG-242 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-CTLA-4 insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia de cadena pesada de SSA, ab con el líder 5', una secuencia de cadena ligera ab, IRES, con un líder 5' y una secuencia de poli (A) 3'.
- 20 SEQ ID NO: 59 Secuencia del genoma del virus NG-165 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia de cadena pesada ab SSA, con el líder 5', una secuencia peptídica P2A, una secuencia de cadena ligera ab con un líder 5' y una secuencia poli (A) 3'.
- 25 SEQ ID NO: 60 Secuencia del genoma del virus NG-190 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo anti-PD-L1 de longitud completa insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia de cadena pesada ab SSA, con el líder 5', una secuencia peptídica P2A, una secuencia de cadena ligera ab con un líder 5' y una secuencia 3' poli (A).
- 30 SEQ ID NO: 61 Secuencia del genoma del virus NG-221 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-PD-L1 con un marcador His $_6$ C-terminal, insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia 5' SSA, anti-PD-L1 ScFv con la secuencia líder 5' y la secuencia 3' 6 x histidina, luego la secuencia poli (A).
- SEQ ID NO: 62 Secuencia del genoma del virus NG-258 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un anticuerpo de longitud completa anti-VEGF insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor de CMV, una secuencia de cadena pesada ab con un líder 5', una secuencia peptídica P2A, una secuencia de cadena ligera ab con un líder 5' y una secuencia poli (A) 3'.
- 35 SEQ ID NO: 63 Secuencia del genoma del virus NG-185 que comprende el genoma EnAd con sitios de restricción únicos insertados en las regiones B χ y B γ .
- 40 SEQ ID NO: 64 Plásmido de ADN pNG-33 (pColoAd2.4), que comprende un origen de replicación bacteriano (p15A), un gen de resistencia a antibióticos (KanR) y la secuencia del genoma EnAd con sitios de restricción únicos insertados en la región B γ .
- SEQ ID NO: 65 Plásmido de ADN pNG-185 (pColoAd2.6), que comprende un origen de replicación bacteriano (p15A), un gen de resistencia a antibióticos (KanR) y la secuencia del genoma EnAd con sitios de restricción únicos insertados en las regiones B χ y B γ .
- 45 SEQ ID NO: 66 Secuencia del genoma del virus NG-sh01 que comprende un casete transgénico que codifica un shRNA a GAPDH insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene un promotor de ARN polIII U6 y ADN que codifica un ARNsh.
- SEQ ID NO: 67 Secuencia de aminoácidos del simportador de yoduro de sodio (NIS).
- 50 SEQ ID NO: 68 Secuencia del genoma del virus NG-280 que comprende un casete transgénico que codifica el simportador de yoduro sódico (NIS) insertado en la región B γ . El casete transgénico contiene una secuencia de ADNc de 5' SSA, NIS y la secuencia 3' poli (A).

SEQ ID NO: 69 Secuencia del genoma del virus NG-272 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF y un ScFv anti-PD-L1 insertado en la región B_γ. El casete transgénico contiene una secuencia SSA, anti-PD-L1 ScFv con 5' líder y el marcador 3' 6xHis, una secuencia peptídica P2A, la secuencia ScFv anti-VEGF con 5' líder y el marcador V5 3' y una secuencia 3' poli (A).

5 SEQ ID NO: 70 Secuencia de aminoácidos de la cadena VH anti-CTLA-4.

SEQ ID NO: 71 Secuencia de aminoácidos de la cadena VL anti-CTLA-4.

SEQ ID NO: 72 Secuencia del genoma del virus NG-257 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF insertado en la región B_x. El casete transgénico contiene una secuencia bSA, ScFv anti-VEGF con el 5' líder y el marcador 6xHis 3' y luego una secuencia 3' poli (A).

10 SEQ ID NO: 73 Secuencia del genoma del virus NG-281 que comprende el genoma EnAd con un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF insertado en la región B_x y un segundo casete transgénico que codifica un ScFv anti-PD-L1 insertado en la región B_γ. El casete transgénico contiene una secuencia bSA, ScFv anti-VEGF con el líder 5' y el marcador 6xHis 3' y luego una secuencia 3' poli (A).

SEQ ID NO: 74 Sitio de restricción reconocido y cortado por la enzima I-Cre1.

15 SEQ ID NO: 75 Sitio de restricción reconocido y cortado por la enzima I-Ceu1.

SEQ ID NO: 76 Sitio de restricción reconocido y cortado por la enzima I-Sce1.

SEQ ID NO: 78-90 muestran cebadores.

Ejemplos

"p" empleado como un prefijo al nombrar las construcciones indica que la construcción es un plásmido.

20 Ejemplos 1-6

Los virus se prepararon con las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 2, 5, 6, 7 y 8, empleando los métodos descritos a continuación.

Cultivo de células

25 Se cultivaron células AD293 (Agilent nº 240085) en glucosa con alto DMEM con glutamina (Gibco: 10109163), L-glutamina 5 mM, piruvato de sodio 2 mM, aminoácidos no esenciales 1 mM (PAA: M11-003) y pen/estrep. Este medio se conoce como 'medio AD293'. Para los medios de cultivo celular de rutina se complementa con 10% de FBS (Gibco: 41965062) y para transfecciones e infecciones con 2% de FBS. Se sembraron 1,2 x 10⁶ células AD293/matraz en matraces T-25 24 horas antes de la transfección de modo que la densidad en la transfección fue aproximadamente 75% confluyente.

30 Transfección del genoma del virus

La concentración del ADN plasmídico para plásmidos, pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-75 y pNG-76, se midió (Tabla 2) y 7,0 µg o cada uno se linealizó entonces con la enzima de restricción Ascl durante 2 horas, 37 grados. El ADN digerido se diluyó con 50 µl de agua sin nucleasas y luego se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo. El ADN extraído se precipitó luego durante 16 horas, -20°C en 300 µl > 95% de etanol de grado biológico molecular y 10 µl 3M de acetato de sodio. El ADN precipitado se sedimentó mediante centrifugación a 14000 rpm, 5 min y se lavó en 500 µl de etanol al 70%, antes de centrifugar de nuevo, 14000 rpm, 5 min. El sedimento de ADN limpio se secó al aire, se resuspendió en 500 µl de OptiMEM que contenía 15 µl de reactivo de transfección de lipofectamina y se incubó durante 30 minutos, RT. La mezcla de transfección luego se añadió gota a gota al matraz T-25 que contenía células AD293. Después de incubar las células con la mezcla de transfección durante 2 horas a 37°C, se añadieron CO₂ al 5%, 4 ml de medio celular (glucosa con alto DMEM con glutamina suplementada con 2% de FBS) a las células y los matraces se incubaron a 37°C, CO₂ al 5 %. Las células se controlaron diariamente para detectar la presencia del efecto citopático (CPE) (Figura 1A-E, Figura 2A-J, Figura 3A-G). Una vez que se observó un CPE sustancial, se recogió el virus y se registró el punto de tiempo de recuperación en la Tabla 2.

Recuperación del virus y amplificación

45 Las células en el medio se pipetearon desde el fondo del matraz y se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 minutos, 1500 rpm, y el sobrenadante se recogió y almacenó (~ 4 ml). El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de medio AD293 y se recogió el virus utilizando tres ciclos de congelación-descongelación. Para esto, los sedimentos celulares se congelaron en nitrógeno líquido y luego se descongelaron en un baño de agua a 37°C antes de la centrifugación a 1200 rpm, 10 minutos y la recogida del sobrenadante que contenía el virus. Los virus recuperados se utilizaron para volver a infectar a células AD293 con el fin de amplificar las reservas del virus. La producción de virus viable durante la amplificación se confirmó mediante la

50

observación de CPE significativo en la monocapa celular (Figura 1F-G, Figura 2K-R, Figura 3H). Una vez que se observó el CPE, el virus se recogió de células 293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. La amplificación en células AD293 se repitió hasta 5 veces hasta que se generaron reservas de virus que produjeron CPE significativo en monocapas celulares en 48 horas de infección (Figura 1H-I, Figura 2S-Z, Figura 2@, Figura 3I-M, Tabla 2).

Purificación del virus

Una vez que se amplificaron las cepas de virus potentes, los virus se purificaron mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir las reservas de virus NG-135, NG-73, NG-74, NG-76 y NG-78. Estas existencias se titularon por medición de Abs 260/280 nm (los títulos se registran en la Tabla 2).

Tabla 2

Virus ID	SEQ ID NO:	[ADN de plásmido] ng/ml	CPE significativo detectado	Ciclos de amplificación	Título del virus agrupado con CsCl (vp/ml)
NG-135	SEQ ID NO: 2	241	216 h	2	1,51e12
NG-73	SEQ ID NO: 8	260	192 h	3	9,90e10
NG-74	SEQ ID NO: 5	253	384 h	5	1,09e11
NG-76	SEQ ID NO: 7	330	184 h	2	9,00e10
NG-78	SEQ ID NO: 6	260	312 h	3	4,50e11

Ejemplo 7. ELISA de unión a VEGF:

La actividad de unión a VEGF del anticuerpo de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de Bevacizumab secretada por células infectadas por EnAd que contiene un gen SSA-Bev-PA (NG-135) fue evaluada por enzimoimmunoanálisis (ELISA).

Las células AD293 se sembraron a una concentración de 3,25e5 células/ml y se dejaron crecer durante 20 horas. Las células se infectaron con EnAd que contenía el casete transgénico SSA-Bev-PA o con un virus de control EnAd que contenía un casete transgénico SSA-GFP-PA (NG-107) (Control). 44 horas después de la infección, los sobrenadantes se recogieron de las células infectadas y se clarificaron por centrifugación.

Se prepararon placas ELISA (una microplaca Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos) recubriendo toda la noche a 4°C con VEGF-165 humano (0,5 µg/ml, R&D Systems, 293-VE-050) en tampón de carbonato/bicarbonato. Las placas se lavaron entre todas las etapas de unión posteriores con PBS 0,05% de Tween 20. Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 3% en PBS Tween 20 al 0,05%. Los sobrenadantes de infección clarificados se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% (1:2, 1:8, 1:32, 1:128, 1:512, 1:2048). Se preparó una dilución en serie de Bevacizumab purificado (100 ng/ml - 0,0128 ng/ml) y se añadieron muestras de Bevacizumab diluidas de 40 ng/ml y 0,2 ng/ml a los sobrenadantes de infección de control. Todas las muestras se añadieron a las placas recubiertas con VEGF-165 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección, anti-humano-Fc conjugado con HRP (Abcam, ab97225) se aplicó luego durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que se realizara la detección de HRP con la solución de sustrato HRP 3.3.5'-terametiletildiamina (TMB, Thermo-Fisher). Se utilizó HCl 1M para detener la reacción y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. Se representó gráficamente la absorbancia a 450 nm para los sobrenadantes de infección EnAd y Control (Figura 4A) que demuestran la unión específica del anticuerpo anti-VEGF secretado en el sobrenadante de las células infectadas con NG-135. Se trazó la curva estándar de Bevacizumab (Figura 6) y las concentraciones de anticuerpo anti-VEGF secretado o las muestras de Bevacizumab añadidas unidas a VEGF se determinaron mediante interpolación a partir de la curva estándar (Figura 4B).

Ejemplo 8: Producción de virus EnAd que codifican anticuerpos anti-VEGF o ScFvs anti-VEGF

El plásmido pEnAd2.4 (también referido en este documento como pColoAd2.4 SEQ ID NO: 64) se usó para generar los plásmidos pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-76, pNG-78 y pNG-167 mediante inserción directa de casetes transgénicos en los sitios de restricción únicos pEnAd2.4 localizados entre los genes L5 y E4 (región B_γ). Los métodos para generar el plásmido se proporcionan en el Ejemplo 31.

Virus preparados

pNG-135 contiene un casete transgénico que codifica un anticuerpo anti-VEGF codificado por la inclusión de una cadena VH anti-VEGF (SEQ ID NO: 29), una cadena pesada constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 33), una cadena VL anti-VEGF (SEQ ID NO: 31) y una cadena ligera constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 35) en el casete

transgénico. pNG-73 y pNG-74 contienen casetes transgénicos que codifican ScFvs anti-VEGF (SEQ ID NO: 36) bajo el control de un promotor exógeno, CMV (SEQ ID NO: 13), o el promotor tardío principal endógeno (MLP) de EnAd. pNG-76, pNG-78 y pNG-167 contienen casetes transgénicos que codifican ScFvs anti-VEGF (SEQ ID NO: 36) con marcadores peptídicos de Histidina C-terminales (SEQ ID NO: 23) bajo el control de un promotor exógeno, CMV (SEQ ID NO: 13), o el MLP endógeno de EnAd. Los esquemas de los casetes transgénicos insertados en los plásmidos pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-76, pNG-78 y pNG-167 se muestran en la Figura 24. La construcción de plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN.

Producción de virus

Los plásmidos pNG-135, pNG-73, pNG-74, pNG-76 y pNG-78 se linealizaron por digestión de restricción con la enzima *Ascl* para producir los genomas del virus NG-135 (SEQ ID NO: 2), NG-73 (SEQ ID NO: 8), NG-74 (SEQ ID NO: 5), NG-76 (SEQ ID NO: 7) y NG-78 (SEQ ID NO: 6). Las reacciones de digestión de restricción se establecieron de acuerdo con la Tabla 3 y se llevaron a cabo durante 2 horas, 37°C:

Tabla 3

Reactivo	Volumen (µl)	Proveedor
ADN de plásmido (~7µg)	~15	
<i>Ascl</i>	2,5	NEB R0558S
Tampón 4	5	NEB B7004S
Agua libre de nucleasa	27,5	Fisher Scientific (BPE 2484-100)

El ADN digerido se diluyó con 50 µl de agua sin nucleasas y luego se purificó por extracción con fenol/cloroforno. El ADN extraído se precipitó luego durante 16 horas, -20°C en 300 µl de etanol de grado biológico molecular > 95% y 10 µl de acetato de sodio 3M. El ADN precipitado se sedimentó por centrifugación a 14000 rpm, 5 minutos y se lavó en 500 µl de etanol al 70%, antes de la centrifugación de nuevo, 14000 rpm, 5 minutos. El sedimento de ADN limpio se secó al aire, se resuspendió en 500 µl de OptiMEM que contenía 15 µl de reactivo de transfección de lipofectamina y se incubó durante 30 minutos, RT. La mezcla de transfección luego se añadió gota a gota a un matraz T-25 que contenía células HEK293 cultivadas hasta un 70% de confluencia. Después de incubar las células con la mezcla de transfección durante 2 horas a 37°C, se añadieron CO₂ al 5%, 4 ml de medio celular (glucosa con DMEM alto con glutamina suplementada con 2% de FBS) a las células y los matraces se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂. Las células HEK293 transfectadas se controlaron cada 24 horas y se suplementaron con medios adicionales cada 48-72 horas. La producción de virus se controló mediante la observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa celular (Figura 1A-E, Figura 2A-J y Figura 3A-G). Una vez que se observó un CPE extenso, el virus se recogió de células 293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Los virus recolectados se usaron para reinfectar células 293 con el fin de amplificar las reservas de virus. La producción de virus viable durante la amplificación se confirmó mediante la observación de CPE significativo en la monocapa celular (Figura 1F-G, Figura 2K-RH, Figura 3H). Una vez que se observó el CPE, el virus se recogió de las células 293 mediante tres ciclos de congelación y descongelación. La amplificación en células 293 se repitió hasta 5 veces hasta que se generaron reservas de virus que produjeron un CPE significativo en monocapas celulares dentro de las 48 horas de infección (Figura 1H-I, Figura 2S-Z, Figura 2@, Figura 3I-M). Una vez que se amplificaron las cepas de virus potentes, los virus se purificaron mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir las reservas de virus NG-135, NG-73, NG-74, NG-76 y NG-78.

Ejemplo 9. Caracterización de la actividad del virus NG-135 en comparación con EnAd en líneas celulares de carcinoma de colon

La replicación del virus NG-135 o EnAd (evaluada por qPCR), la expresión génica (evaluada por RTqPCR) y la expresión del anticuerpo anti-VEGF (evaluada mediante ELISA de unión a VEGF) se comparó en líneas celulares de carcinoma de colon. NG-135 (SEQ ID NO: 2) es un virus derivado de EnAd que contiene un casete transgénico de anticuerpo anti-VEGF después del gen tardío de EnAd, L5 (Fiber). Un esquema del casete insertado se muestra en la Figura 10A y la Figura 24. La producción del virus NG-135 se detalla en el Ejemplo 8. Se sembraron las líneas celulares de carcinoma de colon HCT-116, DLD o HT-29 en placas de 6 pocillos a densidades celulares de 7,5e5 células/pocillo para células HCT-116 y DLD o 2e6 células/pocillo para células HT-29. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37°C, 5% de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 ó 10 partículas de virus EnAd o NG-135 por célula (ppc) o no se infectaran. Los ensayos se llevaron a cabo 24, 48 ó 72 horas después de la infección.

Cuantificación de ADN viral por qPCR

Las líneas de células HT-29 y DLD, infectadas durante 72 horas con 10 ppc de EnAd o NG-135 o no infectadas, se

5 usaron para la cuantificación de ADN viral mediante qPCR. Los sobrenadantes celulares se recogieron y clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. Las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron mediante congelación-descongelación a -20°C en 400 µl/pocillo de 1 X tampón de lisis indicador (Promega: E3971). El ADN se extrajo de 3 µl de lisado celular o 10 µl de sobrenadante usando el kit de extracción de ADN Sigma Genelute, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó y extrajo una curva estándar utilizando partículas de virus EnAd (2,5e10-2,5e5 pv) utilizando el kit Sigma Genelute. Cada muestra o estándar extraído se analizó mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico del gen EnAd E3 en la mezcla de reacción detallada en la Tabla 4.

Tabla 4

Reactivo	Volumen/pocillo (µl)
Mezcla maestra de avance rápido (Lifetech)	5
Cebador directo EnAd	0,08
Cebador inverso EnAd	0,08
Sonda EnAd	0,02
NFW	2,82
Muestra	2
Volumen de pocillo	10

10

La qPCR se llevó a cabo de acuerdo con el programa en la Tabla 5:

Tabla 5

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración (s)
1	50	120
1	95	20
40	95	1
	60	20

15 La cuantificación del número de genomas víricos detectados por célula demostró que la replicación del virus NG-135 o EnAd era comparable en ambas líneas celulares HT-29 y DLD (Figura 11A). No se pudieron detectar genomas de virus en células no infectadas (datos no mostrados).

Análisis de la expresión génica del anticuerpo viral (hexón) o anti-VEGF mediante RTqPCR

20 Las líneas celulares HT-29 y DLD, infectadas durante 72 horas con 10 ppc de EnAd o NG-135 o sin infectar, se usaron para el análisis de la expresión génica del anticuerpo hexón o anti-VEGF mediante RTqPCR. El sobrenadante se eliminó de cada pocillo y las células se lavaron con PBS y luego se lisaron en 600 µl/pocillo de tampón RLT (QIAGEN) que contenía β-mercaptoetanol (1:100). Los lisados celulares se clarificaron mediante centrifugación durante 3 minutos, 13000 rpm, y luego se usaron 200 µl del lisado para la extracción del ARN utilizando el kit de extracción de ADN/ARN/proteína Allprep (QIAGEN) según el protocolo del fabricante. Se midió la concentración de ARN extraído de cada muestra y se usaron 800 ng para la síntesis de ADNc utilizando Superscript III First Strand Synthesis SuperMix para qRT-PCR (Life Technologies; 11752-050) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 1 µl de cada muestra de ADN sintetizada se usó para el análisis mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico de héxon de EnAd o un conjunto de cebador-sonda específico del anticuerpo anti-VEGF en la mezcla de reacción detallada a continuación, Tabla 6.

25

Tabla 6

Reactivo	Volumen/pocillo (μ l)
Mezcla maestra de avance rápido Taqman (Lifetech)	5
Cebador directo	0,08
Cebador inverso	0,08
Sonda	0,02
NFW	3,82
Muestra	1
Volumen de pocillo	10

5 La qPCR se llevó a cabo de acuerdo con el programa en la Tabla 5. La cuantificación del número de copias de ADN detectadas por qPCR demostró una expresión comparable del gen tardío del virus, Hexón, en células HT-29 o DLD infectadas con NG-135 o EnAd (Figura 11B). Sin embargo, la expresión del gen del anticuerpo anti-VEGF solo se detectó en células HT-29 o DLD infectadas con el virus NG-135 que contenía el casete transgénico del anticuerpo anti-VEGF (Figura 12).

Análisis de la expresión del anticuerpo anti-VEGF mediante ELISA de unión a VEGF

10 Las líneas celulares HT-29, DLD y HCT-116, infectadas ya sea durante 24, 48 como 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-135 o no infectadas, se usaron para el análisis de la expresión del anticuerpo mediante ELISA de unión a VEGF. Los sobrenadantes de cultivo se eliminaron de cada pocillo y se centrifugaron durante 5 minutos, 1200 rpm para eliminar los restos celulares. Se recubrieron placas de ELISA (microplaca Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos) con VEGF-165 humano (0,5 μ g/ml, R&D Systems, 293-VE-050) y se bloquearon según los métodos detallados en el Ejemplo 7. Los sobrenadantes de infección se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% (1:2 ó 1:4) y se preparó una dilución en serie de anticuerpo anti-VEGF purificado (100 ng/ml - 0,0128 ng/ml). Todas las muestras se añadieron a las placas recubiertas con VEGF-165 y se analizaron de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 7. Las concentraciones de anticuerpo anti-VEGF secretado unido a VEGF se determinaron mediante interpolación a partir de las curvas estándar. La expresión del anticuerpo anti-VEGF aumentó con el tiempo en células HT-29, DLD y HCT hasta 72 horas, en cuyo punto se detectó una expresión de anticuerpo comparable en el sobrenadante de todas las líneas celulares ensayadas (Figura 13).

Ejemplo 10. Cuantificación de la expresión del anticuerpo anti-VEGF en líneas celulares de carcinoma de colon y carcinoma de pulmón

25 Líneas celulares de carcinoma de colon HT-29 y carcinoma de pulmón A549 se pusieron en placas de 12 pocillos a densidades de 1×10^6 células/pocillo para las células HT-29 y 5×10^5 células/pocillo para A549. Las placas se incubaron durante 24 horas, 37°C, 5% de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 partículas de virus EnAd o NG-135 por célula (ppc) o no se infectaron. Los ensayos se llevaron a cabo 24, 48 ó 72 horas después de la infección.

30 En cada punto de tiempo, los sobrenadantes de cultivo se eliminaron de cada pocillo y se reemplazaron con 400 μ l de medio de cultivo celular. Después, las placas se incubaron durante 5 minutos, 1 hora o 3 horas antes de recoger los medios de cada pocillo y se centrifugaron durante 5 minutos, 1200 rpm para eliminar los restos celulares. Se recubrieron placas de ELISA (microplaca Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos) durante 16 horas, 4°C, con anticuerpo monoclonal antihumano IgG1 Fc de ratón (2 μ g/ml, ab1927, Abcam) diluido en tampón de carbonato/bicarbonato. Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 3% en PBS Tween 20 al 0,05% antes de lavarse con PBS Tween 20 al 0,05%. Las placas se lavaron 3 veces con PBS Tween 20 al 0,05% entre todas las etapas de unión posteriores.

35 Los sobrenadantes de infección clarificados se diluyeron en BSA al 3%/PBS Tween 20 al 0,05% (1:2, 1:8, 1:32). También se preparó una dilución en serie de Bevacizumab purificado (200 ng/ml-0,1 ng/ml) en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%. Se añadieron muestras y patrones a las placas revestidas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección, anti-humano-IgG-Fab conjugado con HRP (0,5 μ g/ml de Abcam ab87422) se aplicó luego durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que se realizara la detección de HRP con la solución de sustrato de HRP 3.3.5.5'-terametilendiamina (TMB, Thermo-Fisher). Se utilizó HCl 1M para detener la reacción y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. Las concentraciones de anticuerpo anti-VEGF secretado en células HT-29 (Fig. 28A) y células A549 (Fig. 28B) se determinaron mediante la interpolación de las curvas estándar. La proteína total que se predijo que sería expresada por 1×10^6 células HT-29 o A549 durante 24, 48 y 72 horas se resume en la figura 28C.

Ejemplo 11. Expresión de ScFv anti-VEGF en una línea celular de carcinoma de colon

5 NG-76 (SEQ ID NO: 7), NG-78 (SEQ ID NO: 6) y la expresión de ScFv anti-VEGF de EnAd se compararon en células de carcinoma de colon HT29 mediante western blot. NG-76 y NG-78 son virus derivados de EnAd que contienen casetes transgénicos ScFv anti-VEGF después del gen tardío EnAd, L5 (Fibra). Los esquemas de los casetes insertados se muestran en la Figura 10B y C y la producción de los virus se describe en el Ejemplo 8. Se sembraron células HT-29 en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 4e6 células/pocillo y se incubaron durante 5 horas a 37°C, 5% de CO₂. Las células se infectaron luego durante 22, 46 ó 70 horas con 50 partículas de virus NG-76, NG-78 o EnAd por célula. Se retiró el medio de los pocillos y las células se lavaron una vez con PBS antes de la lisis en 250 µl de tampón de lisis (NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,5%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)) que contiene el cóctel III de inhibidor anti-proteasa (Calbiochem: 539134). Los lisados se trataron con benzonasa para degradar el ADN genómico y se diluyeron adicionalmente 1:4 en tampón de lisis que contenía tampón de muestra NuPAGE LDS y agente reductor NuPAGE (Life Technologies). Las muestras se calentaron durante 10 minutos, 70°C antes de llevar a cabo SDS-PAGE usando 4-12% de geles Bis-Tris NuPAGE (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF mediante transferencia Western utilizando el módulo de transferencia Xcell II (Life Technologies). El bloqueo y la inmunotransferencia se llevaron a cabo en PBS Tween-20 al 0,1% suplementado con 5% de leche en polvo y todas las etapas de lavado se llevaron a cabo en PBS Tween-20 al 0,1%. Los ScFv anti-VEGF se detectaron utilizando anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ct-Hisx6 para el marcador His en el extremo C del ScFv y la detección del anticuerpo secundario se llevó a cabo usando IgG-HRP de conejo anti-ratón.

10

15

20 Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada. La expresión de ScFv pudo detectarse en lisados de células HT-29 infectados con NG-76 o NG-78 pero no en células infectadas con EnAd (marcadas como 76, 78 y Ad1, respectivamente en la Figura 14A). La expresión de ScFv fue detectable antes, en 22 horas, en células infectadas con el virus NG-76 en el que la expresión de ScFv está bajo el control de un promotor exógeno en comparación con el virus NG-78 en el que la expresión de ScFv está bajo el control del promotor tardío principal endógeno.

25

Ejemplo 12. Expresión de ScFv anti-VEGF detectada mediante ELISA de unión a VEGF

Se comparó la expresión de NG-76 (SEQ ID NO: 7) y EnAd, ScFv anti-VEGF en líneas celulares de riñón embrionario humano mediante ELISA de unión a VEGF o transferencia de Western. Las células AD293 se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 5e5 células por pocillo. 24 horas después de la siembra, las células AD293 se infectaron con 100 partículas de virus NG-76 o EnAd por célula. Las células se cultivaron durante 72 horas antes de que los sobrenadantes se recogieran de los pocillos y se centrifugaran durante 5 minutos, 1200 rpm para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes clarificados se usaron luego para el ELISA de unión a VEGF o el análisis de transferencia de Western. Para los sobrenadantes de ELISA se diluyeron 1:2 en BSA al 3%/PBS Tween al 0,05% y luego se les añadieron 8 ng/ml de anticuerpo anti-VEGF o se dejaron sin anticuerpo. Las placas de ELISA se recubrieron con VEGF y se bloquearon de acuerdo con el método detallado en el Ejemplo 7. Las muestras se añadieron a las placas a 100 µl/pocillo y se analizaron. El anticuerpo de detección, anti-His policlonal conjugado con HRP (Abcam ab1187) se aplicó luego durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que se realizara la detección de HRP con la solución de sustrato HRP 3.3.5.5'-terametiletilendiamina (TMB, Thermo-Fisher). Se utilizó HCl 1M para detener la reacción y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. Se representó gráficamente la absorbancia a 450 nm para los sobrenadantes de infección por anticuerpos anti-VEGF EnAd, NG-76 y NG-76 + 8 ng/ml (Figura 14B). La especificidad del ScFv expresado para VEGF en los sobrenadantes de las células infectadas con NG-76 se confirmó mediante la inhibición parcial de la unión de VEGF mediante la adición de 8 ng/ml de anticuerpo anti-VEGF humano purificado, bevacizumab. Para la transferencia Western, se prepararon los sobrenadantes y se ensayaron según los métodos detallados en el Ejemplo 11. La expresión de ScFv pudo detectarse a bajos niveles 24 horas después de la infección y la expresión tuvo un incremento significativo en 44 horas (Figura 7).

30

35

40

45

Ejemplo 13. Caracterización de la actividad del virus NG-135 en comparación con EnAd en ratones con tumores

Se implantaron células de carcinoma de colon DLD o HCT-116 como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu. Una vez que los tumores alcanzaron ~ 100 mm³, se agruparon los ratones y se trataron con 5e9 partículas de virus EnAd o NG-135 administradas por inyección intratumoral única. En cada estudio, también se incluyó un grupo de ratones control no infectados. Los tumores DLD se extirparon el día 3, 7 ó 28 después del tratamiento y los tumores HCT-116 se extirparon el día 3, 7 ó 14 después del tratamiento.

50

Análisis de la replicación del genoma del virus por qPCR

Los tumores extirpados se pesaron y se homogeneizaron en tampón de lisis indicador 1X (Promega E3971) que contenía un cóctel III de inhibidor anti-proteasa 1:200 (Calbiochem) a una concentración de 100 µl de tampón por 25 mg de tumor. Los homogeneizados tumorales no tratados se usaron para preparar una curva estándar de virus EnAd (2,5e10 - 2,5e5 pv/muestra de lisado tumoral). El ADN se extrajo de 2µl de cada muestra de tumor tratada o de 100 µl de cada estándar usando el kit de extracción de ADN de Sigma Genelute, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras extraídas y los estándares se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-

55

sonda específico de gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos de qPCR detallados en el Ejemplo 8. La cuantificación del número de genomas de virus por tumor se muestra para los tumores de DLD el día 3 o el día 7 después del tratamiento (Figura 15A) o el día 28 después del tratamiento (Figura 15B). La cuantificación del número de genomas de virus por tumor se muestra para los tumores HCT el Día 3, Día 7 o Día 14 después del tratamiento con EnAd o NG-135 (Figura 18A). En conjunto, los datos no muestran diferencias significativas entre la replicación del virus EnAd y NG-135 en tumores HCT o DLD.

5

Análisis de la expresión génica del anticuerpo viral (hexón) o anti-VEGF mediante RTqPCR

Los tumores extirpados se pesaron y se homogeneizaron en tampón de lisis RLT (QIAGEN) que contenía β -mercaptoetanol (Sigma) a una concentración de 350 μ l de tampón por 20 mg de tumor. El ARN se extrajo de las muestras tumorales utilizando el mini kit AllPrep de ADN/ARN/proteína (QIAGEN) y se trató con el conjunto de ADNasa libre de ARNasa (QIAGEN) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se midió la concentración de ARN extraído de cada muestra y se usaron 800 ng para la síntesis de ADNc y qPCR de acuerdo con los métodos RTqPCR detallados en el Ejemplo 8. La cuantificación del número de copias de ARN detectadas por qPCR demostró una expresión comparable del gen tardío del virus, hexón, en tumores DLD tratados con NG-135 o EnAd el día 3 o día 7 después del tratamiento (Figura 16A). Por el contrario, la expresión del gen del anticuerpo anti-VEGF (ARN) solo se detectó en células DLD tratadas con el virus NG-135 (Figura 16B).

10

15

Expresión del anticuerpo anti-VEGF detectada mediante ELISA de unión a IgG1 anti-humano o VEGF

Los lisados tumorales extirpados preparados para qPCR (anterior) también se usaron para el análisis de la expresión del anticuerpo anti-VEGF mediante ELISA de IgG1 antihumana (kit Abcam) o ELISA de unión a VEGF. El suero de muestras de sangre tomadas en el punto de resección del tumor también se analizaron para IgG1 humana mediante ELISA. Antes de ensayar los lisados tumorales de los ratones tratados y del control se diluyeron 1:2 en 150 μ l de 1X indicador o tampón de lisis (Promega) que contenía 2% de Triton X-100, se sometieron a vórtex brevemente y se sonicaron durante 5 minutos en un baño maría sonicante. Las muestras de sangre se centrifugaron durante 5 minutos, 5000 rpm y se recogió el suero. Se preparó una dilución en serie de anticuerpo anti-VEGF purificado, bevacizumab (100 ng/ml - 0,0128 ng/ml) y se inyectó en lisados de ratones de control combinados o muestras de suero de ratones no tratados para producir las curvas patrón de ensayo.

20

25

ELISA de IgG1 humana (Abcam)

Los lisados sonicados de tumores tratados con NG-135 o EnAd se diluyeron adicionalmente 1:2 en tampón de ensayo y, como control positivo, una muestra de lisado tumoral de ratón tratada con EnAd se enriqueció con 8 ng/ml de bevacizumab purificado. Las muestras de suero se diluyeron 1:2 ó 1:5 en tampón de ensayo. Todas las muestras y estándares se analizaron luego para detectar la IgG1 antihumana utilizando el kit de ELISA Abcam de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de anticuerpo en los tumores se determinaron mediante la interpolación de las curvas estándar. La expresión del anticuerpo IgG1 humano pudo detectarse en tumores DLD tratados con NG-135 y analizados 28 días después del tratamiento (Figura 17A) y en una muestra de suero de un ratón tratado con NG-135 analizado 28 días después del tratamiento (Figura 19). El anticuerpo también se detectó en todos los tumores HCT-116 tratados con NG-135 y ensayados 3, 7 ó 14 días después del tratamiento (Figura 18B). No se pudo detectar la expresión de anticuerpos en ningún tumor o muestras de sangre de ratones tratados con EnAd.

30

35

ELISA de unión a VEGF

Los lisados sonicados de tumores tratados con NG-135 o EnAd se diluyeron adicionalmente 1:2 en tampón de ensayo y, como control positivo, una muestra de lisado tumoral de ratón tratada con EnAd se enriqueció con 1,6 ng/ml de bevacizumab purificado. Se recubrieron placas ELISA (microplaca Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos) con VEGF-165 humano (0,5 μ g/ml) de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 7. Se añadieron muestras y sobrenadantes de patrones a las placas recubiertas con VEGF-165 y se analizaron de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 7. Las concentraciones de anticuerpo de unión anti-VEGF en los tumores se determinaron interpolando a partir de la curva estándar. El anticuerpo anti-VEGF capaz de unirse a hVEGF-165 fue detectable en muestras de tumor DLD tratadas con NG-135 pero no en muestras tratadas con EnAd (Figura 17B).

40

45

Ejemplo 14. Producción y caracterización de virus EnAd que codifican genes indicadores

Se produjo un panel de GFP o virus indicadores que expresan luciferasa en los que la expresión transgénica estaba bajo el control de un promotor viral exógeno, CMV (NG-47, NG-61, un promotor de mamífero exógeno, PGK (NG-159), el promotor principal tardío del virus endógeno (NG-62, NG-63, NG-93, NG-98, NG-105, NG-106, NG-107, NG-108) o el promotor temprano del virus endógeno, E4 (NG-109, NG-110). Todos los virus se derivaron de EnAd usando el plásmido de clonación pEnAd2.4 (descrito en la solicitud número GB1322851.5) y tienen casetes transgénicos insertados después del gen tardío EnAd, L5 (Fibra).

50

55

Producción de virus

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los plásmidos pNG-47, pNG-62, pNG-93, pNG-105, pNG-106, pNG-107,

pNG-108, pNG-109, pNG-110 y pNG-159 mediante inserción directa de casetes transgénicos que codificaban la proteína verde fluorescente (GFP, SEQ ID NO: 38) en los sitios de restricción únicos pEnAd2.4 ubicados entre los genes L5 y E4. Los esquemas de los casetes transgénicos insertados en los plásmidos pNG-47, pNG-62, pNG-93, pNG-105, pNG-106, pNG-107, pNG-108, pNG-109, pNG-110 y pNG-159 se muestran en la Figura 22. El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) también se usó para generar los plásmidos pNG-61 y pNG-63 por inserción directa de casetes transgénicos que codifican la proteína luminiscente, luciferasa (SEQ ID NO: 39), en los sitios de restricción únicos de pEnAd2.4. Los esquemas de los casetes transgénicos insertados en los plásmidos pNG-61 y pNG-63 se muestran en la Figura 22. Todos los plásmidos se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos que codifican los genes indicadores se linealizaron y se transfetaron en células HEK293 para producir partículas de virus de acuerdo con los métodos de "producción de virus" detallados en el Ejemplo 8. Las partículas de virus amplificadas se purificaron mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir reservas de virus; NG-47, NG-62, NG-93, NG-105, NG-106, NG-107, NG-108, NG-109, NG-110, NG-61 y NG-63.

Caracterización de los virus

La replicación de los virus NG-47, NG-62, NG-93, NG-105, NG-106, NG-107, NG-108, NG-109, NG-110 o EnAd (evaluado por qPCR) y la expresión del gen GFP (evaluado por ensayo de fluorescencia) fueron comparadas en la línea celular de carcinoma de colon, HT-29. Las líneas celulares de carcinoma de colon HT-29 se sembraron en placas de 12 pocillos a densidades celulares de $1e6$ células/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 horas, 37°C , 5% de CO_2 , antes de que las células se infectaran con 1 partícula de virus por célula (ppc) de cada uno de los virus detallados anteriormente o no se infectaran. Los ensayos se llevaron a cabo 24, 48, 72 ó 96 horas después de la infección.

Cuantificación del ADN viral por qPCR

Los sobrenadantes celulares se recogieron y clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. Las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron mediante congelación-descongelación a -20°C en tampón de lisis indicador 1 X a $400 \mu\text{l/pocillo}$ (Promega: E3971). El ADN se extrajo de $1 \mu\text{l}$ de lisado celular o $10 \mu\text{l}$ de sobrenadante utilizando el kit de extracción de ADN Sigma Genelute, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó y extrajo una curva estándar utilizando partículas de virus EnAd ($2,5e10$ - $2,5e5$ pv) utilizando el kit de Sigma Genelute. Cada muestra o estándar extraído se analizó mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico del gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos de qPCR detallados en el ejemplo 9. La cuantificación del número de genomas de virus por célula se muestra 24, 48, 72 ó 96 horas después de la infección (Figura 27A).

Cuantificación de la expresión transgénica por fluorescencia

Los lisados celulares preparados anteriormente se analizaron usando $25 \mu\text{l}$ de lisado puro descongelado o tampón de lisis indicador 1x diluido 1:2 lisado (Promega: E971). El nivel de fluorescencia de GFP en cada pocillo se midió en un lector de placas (BioTek Synergy HT). La fluorescencia medida, con sustracción de fondo, para las muestras infectadas durante 24, 48, 72 ó 96 horas se representa gráficamente en la Figura 27B.

Ejemplo 15. Caracterización de virus EnAd que codifican genes indicadores bajo el control del promotor exógeno, CMV

La replicación del virus (evaluada por qPCR), la actividad oncolítica (evaluada por el ensayo de viabilidad celular) y la expresión del gen indicador (evaluado por fluorescencia) para los virus indicadores NG-47 y NG-61 se compararon con EnAd. La producción y el diseño de los virus NG-47 y NG-61 se detallan en el Ejemplo 14.

Caracterización de la replicación del virus y la expresión transgénica

Se sembraron células de carcinoma de colon HT-29, la línea celular de fibroblastos WI38 o la línea celular de fibroblastos MRC5 en placas de 6 pocillos a una densidad celular de $2,5e6$ células/pocillo. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37°C , 5% de CO_2 , antes de que las células se infectaran con 1 partícula de virus EnAd, NG-47 o NG-61 por célula (ppc). Los ensayos se llevaron a cabo 24, 48, 72 ó 96 horas después de la infección. Los sobrenadantes celulares se recogieron y clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. Las células se lavaron una vez con PBS y se lisaron mediante congelación-descongelación a -20°C en tampón de lisis indicador 1 X a $400 \mu\text{l/pocillo}$ (Promega: E3971). El ADN se extrajo del lisado celular o sobrenadante utilizando el kit de extracción de ADN Sigma Genelute, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó y extrajo una curva estándar utilizando partículas de virus EnAd ($2,5e10$ - $2,5e5$ pv) utilizando el kit de Sigma Genelute. Cada muestra extraída o patrón se analizó mediante qPCR usando un cebador-sonda específico del gen EnAd E3. La cuantificación del número de genomas de virus detectados por célula demostró que la replicación de NG-47 y NG-61 era comparable a EnAd (marcado como EnAd en las Figs. 25 y 26) en células HT29 (Figuras 25A y 25B) y en las líneas celulares HT29, WI38 y MRC5 (Figura 26C). Los lisados de células NG-47 y EnAd preparados anteriormente también se usaron para evaluar la expresión transgénica. La fluorescencia de GFP relativa se midió en un lector de placas (BioTek) en lisado neto o lisado diluido 1:2 en tampón de lisis indicador 1X (Figura 25C).

Comparación de la potencia oncolítica del virus

Se sembraron células de carcinoma de colon HT-29 en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 2,5e4 células/pocillo. Las placas se incubaron durante 4 horas, 37°C, 5% de CO₂, antes de que las células se infectaran con partículas de los virus EnAd, NG-47 o NG-61 en un intervalo de densidad de infección de 100-0,39 partículas por célula (ppc). La viabilidad de las células HT-29 se evaluó usando Cell Titre 96 MTS Reagent (Promega: G3581) 72 horas después de la infección. La cuantificación del % de supervivencia celular en cada densidad de infección demostró que la potencia oncolítica de NG-47 y NG-61 era comparable a EnAd en células HT29 (Figuras 26A y 26B).

Ejemplo 16: Producción de virus EnAd que codifican anticuerpos para las proteínas de la ruta del inhibidor del punto de control inmune

El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se usó para generar el plásmido pNG-177, mediante la inserción directa de un casete transgénico que codificaba un anticuerpo PD-L1 anti-humano (YW243.55.S70) entre los sitios de restricción únicos pEnAd2.4 localizados entre los genes L5 y E4. El plásmido pNG-177 codifica una cadena VH anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 30), una cadena pesada constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 34), una cadena VL anti-VEGF (SEQ ID NO: 32) y una cadena ligera constante del anticuerpo (SEQ ID NO: 35). En la Figura 24 se muestra un esquema del casete de anticuerpo anti-PD-L1 insertado presente en el genoma del virus NG-177 (SEQ ID NO: 46).

Ejemplo 17: Producción y caracterización de virus EnAd que codifican citocinas

Producción de virus

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los plásmidos pNG-92, pNG-95, pNG-96, pNG-97, pNG-139 y pNG-136 mediante inserción directa de casetes transgénicos que codifican interferón- γ humano (IFN γ (SEQ ID NO: 41; pNG-92 y pNG-95), interferón- α humano (IFN α SEQ ID NO: 42; pNG-96 y pNG97) o factor de necrosis tumoral alfa humano (hTNF α SEQ ID NO: 40; pNG-139) en los sitios de restricción únicos pEnAd2.4 localizados entre los genes L5 y E4 (región By). Los esquemas de los casetes transgénicos insertados en los plásmidos pNG-92, pNG-95, pNG-96, pNG-97 y pNG-139 se muestran en la Figura 23. La construcción de plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN.

Los plásmidos pNG-92, pNG-95 y pNG-139 se linealizaron para producir los genomas NG-92 (SEQ ID NO: 51), NG-95 (SEQ ID NO: 49) y NG-139 (SEQ ID NO: 53). Los genomas se transfectaron en células HEK293 para producir partículas de virus de acuerdo con los métodos de "producción de virus" detallados en el Ejemplo 8. Las partículas de virus amplificadas se purificaron mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir las reservas de virus NG-92, NG-95 y NG-139. La producción de partículas viables del virus NG-139 durante la amplificación se confirmó por inmunotinción para la proteína de la cápside EnAd, Hexón. Las células HT-29 se infectaron con lisado de virus durante 48 horas, los medios se eliminaron de las células, las células se fijaron en MeOH:acetona 1:1 y se tñieron con anticuerpo anti-adenovirus (Abcam: ab7428) durante 1 hora a TA. Las células se lavaron luego y se llevó a cabo la detección del anticuerpo secundario usando IgG anti-ratón conjugada con HRP (Abcam: ab6728). La proteína Hexón se visualizó mediante la adición de sustrato DAB durante 25 minutos. La tinción de Hexón pudo detectarse a través de las monocapas celulares (Figura 29A y Figura 29B).

Cuantificación de la producción de TNF α en líneas celulares de carcinoma de colon y un modelo de tumor de xenoinjerto subcutáneo de carcinoma de colon

Las líneas celulares de carcinoma de colon HT-29 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 5e5 células/pocillo. Las células se infectaron con 100 partículas de virus NG-139 por célula (ppc) o no se infectaron. Los ensayos se llevaron a cabo 24 ó 36 horas después de la infección.

En cada punto de tiempo, los sobrenadantes de cultivo se eliminaron de cada pocillo y se centrifugaron durante 5 minutos, 1200 rpm, para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes clarificados se diluyeron en tampón de ensayo y se usaron en un ELISA de TNF α de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de TNF α secretado se determinaron mediante la interpolación de las curvas estándar y se muestran en la Figura 29C.

Se implantaron células de carcinoma de colon DLD como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu. Una vez que los tumores alcanzaron $\sim 100 \text{ mm}^3$, se agruparon los ratones y se trataron con 5e9 partículas de virus EnAd o NG-139 administradas por inyección intratumoral única en los días 0, 3 y 6. En cada estudio, también se incluyó un grupo de ratones control no infectados. Los tumores DLD se extirparon el día 15 posterior al tratamiento y se ensayó la producción de TNF α mediante ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las concentraciones de TNF α detectadas en el tumor se determinaron por interpolación a partir de la curva estándar y se muestran en la Figura 29D.

Ejemplo 18: Replicación de virus y expresión de anticuerpos anti-VEGF en líneas celulares de carcinoma de colon, ovario y pulmón

La replicación del virus NG-135 (SEQ ID NO: 2) y EnAd, y la expresión del anticuerpo anti-VEGF se compararon en

líneas celulares de carcinoma de colon (HT-29, HCT116, DLD), pulmón (A549) u ovárico (SKOV3) mediante ELISA de h1gG1. Las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo. 24 horas después de la siembra, las líneas celulares se infectaron con NG-135 o EnAd a 100 partículas de virus por célula. Las células se cultivaron durante 24, 48, 72, 96 ó 120 horas antes de que los sobrenadantes se recogieran de los pocillos y se centrifugaran durante 5 minutos, 1200 rpm, para eliminar los restos celulares. La mitad del sobrenadante se usó para evaluar la producción de anticuerpos y la otra mitad se usó para evaluar los

5 genomas del virus. Las células en cada pocillo se lavaron con 1xPBS y se lisaron en tampón de lisis indicador 1 X (Promega). Los lisados se congelaron-descongelaron y luego se evaluó la replicación del virus.

El ADN se extrajo de 1-5 μ l del lisado celular o 10 μ l del sobrenadante utilizando el kit de extracción de ADN de Sigma Genelute, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó y extrajo una curva estándar utilizando partículas de virus EnAd ($2,5 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^5$ pv) utilizando el kit de Sigma Genelute. Cada muestra o estándar extraído se analizó mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico del gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 9. La replicación máxima en todos los puntos de tiempo en cada línea celular se traza para EnAd y NG-135 en la Figura 33A.

15 Se prepararon placas de ELISA (microplaca Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos) recubriendo durante la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 Fc anti-humano (ab1927 Abcam) en tampón de carbonato/bicarbonato. Las placas se lavaron entre todas las etapas de unión posteriores con PBS Tween 20 al 0,05%. Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 3% en PBS Tween 20 al 0,05%. Los sobrenadantes de infección clarificados se diluyeron en BSA al 3% en PBS Tween 20 al 0,05% (1:2, 1:4, 1:16). Se preparó una dilución en serie de Bevacizumab purificado (1000 ng/ml - 0,0128 ng/ml) y se diluyó. Las muestras de bevacizumab de 8 ng/ml también se añadieron a los sobrenadantes de infección de control. Todas las muestras se añadieron a las placas revestidas y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección, anti-Fab anti-humano conjugado con HRP se aplicó luego durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que se realizara la detección de HRP con la solución de sustrato HRP 3.3.5.5'-tetrametiletildiamina (TMB, Thermo-Fisher). Se utilizó HCl 1M para detener la reacción y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. Las concentraciones de anticuerpo anti-VEGF secretado se determinaron interpolando a partir de la curva estándar de Bevacizumab (Figura 33B).

Ejemplo 19: Caracterización de la producción de anticuerpos a partir de tumores tratados con NG-135

Se implantaron células de carcinoma de colon HCT-116 como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu. Una vez que los tumores alcanzaron $\sim 100 \text{ mm}^3$, se agruparon los ratones y se trataron con 5×10^9 partículas de virus EnAd o NG-135 administradas por inyección intratumoral única. 10 días después del tratamiento, los tumores de algunos animales se extirparon, se pesaron y se cortaron en secciones de $\sim 100 \text{ mg}$. Cada sección se colocó en una copa de filtro (Nunc) en una placa de 12 pocillos y luego se cultivó ex vivo durante 7 días en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Las secciones del tumor y los medios de cultivo ex vivo se ensayaron para la replicación del genoma viral o la expresión del anticuerpo en los días 0 ó 7 después de la resección. Se tomaron sueros de otros animales para las mediciones del anticuerpo anti-VEGF circulante.

Análisis de la replicación del genoma del virus mediante qPCR

Los medios de cultivo se eliminaron de las copas de filtro y del pocillo circundante. Para la qPCR, las muestras de los medios se diluyeron 1:200 en tampón de resuspensión del kit de extracción de ADN de Sigma Genelute y se homogenizaron secciones tumorales extirpados o cultivados en tampón de lisis indicador 1 x (Promega E3971) que contenía un cóctel de inhibidor anti-proteasa 1:200 a una concentración de 100 μ l de tampón por 25 mg de tumor. Se prepararon los estándares EnAd y la extracción del ADN y la qPCR se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 13. La cuantificación del número de genomas de virus por tumor en el día 0 o el día 7 después de la resección demostró un aumento en los genomas virales totales en el día 7 tanto para EnAd como para NG-135 lo que sugiere una producción de genoma viral continua durante el cultivo ex vivo. Los datos para NG-135 se muestran en la Figura 35A.

Análisis de la expresión del anticuerpo anti-VEGF por IgG1 anti-humano

Se usaron muestras tumorales homogeneizadas o muestras de medios puros preparadas para qPCR para el análisis de la expresión del anticuerpo mediante ELISA IgG1 antihumano. Las muestras se diluyeron 1:2 en BSA al 3%/PBS Tween al 0,05% y luego se llevó a cabo el ELISA de IgG1 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 18. El anticuerpo pudo detectarse en tumores HCT-116 en el punto de la resección (día 0) pero la cantidad de anticuerpo detectable producido por los tumores había aumentado significativamente después de 7 días de cultivo ex vivo (Figura 35B). Los sueros procedentes de ratones tomados el día 7 ó 14 después de la inyección IT con NG-135, analizados mediante ELISA IgG1 antihumano, mostraron niveles detectables de anticuerpo el día 14 (Figura 35C). No se pudo detectar ningún anticuerpo en sueros o muestras de cultivo ex vivo de ratones que habían sido tratados con EnAd.

Ejemplo 20: Caracterización de la actividad del virus NG-135 en un modelo murino de xenoinjerto ortotópico de cáncer de pulmón

Se inyectaron células de carcinoma de pulmón A549 por vía intravenosa en ratones SCID CB17 y se permitió el desarrollo de tumores en los pulmones. 8 semanas después de la inyección, los ratones se agruparon y se trataron con partículas de virus 5e9 EnAd o NG-135 administradas por vía intravenosa o no se trataron mediante inyección de solo PBS. Se recogieron pulmones e hígados de los ratones el día 3, 11, 18 ó 25 después del tratamiento (Figura 36A). En cada punto de tiempo, se extirparon todos los nódulos tumorales visibles en el pulmón y tanto los nódulos reunidos de cada pulmón como los tejidos pulmonares restantes se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Los nódulos del tumor pulmonar y del tejido pulmonar se evaluaron para determinar la carga del tumor A549 y los genomas del virus mediante qPCR.

Análisis de la replicación del genoma viral o carga de las células A549 por qPCR

El tejido pulmonar extirpado, los nódulos tumorales o los tejidos hepáticos se homogeneizaron en 1 x tampón de lisis indicador. El ADN se extrajo de 10-100 µl de las muestras homogeneizadas usando el kit de extracción de ADN de Sigma Genelute de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para evaluar la replicación del genoma vírico, se prepararon y analizaron muestras y curvas estándar de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 13. Para evaluar la carga de las células A549 se preparó una curva estándar añadiendo células A549 (células 2,25e6 - 3,6e3) en tejido pulmonar homogenizado no tratado y luego extrayendo el ADN total usando el kit de extracción de ADN de Sigma Genelute. Los estándares y muestras extraídos se analizaron para determinar la carga de las células A549 mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico del gen del receptor de prostaglandina E humana (PTGER2) y la mezcla de reacción y el programa se utilizaron para EnAd qPCR como se detalla en el Ejemplo 9. La cuantificación de la carga tumoral de A549 el día 3 posterior al tratamiento mostró una carga tumoral de A549 similar en ratones tratados con NG-135 y PBS control. Pero el día 25, la carga tumoral en ratones tratados con NG-135 fue significativamente menor que el grupo de control con PBS (Figura 36B). El grado de carga tumoral en los pulmones de ratones individuales se correlacionó con la replicación del virus (Figura 36C) y esta selectividad de la replicación del virus se demostró después mediante un aumento de ~ 2 log en partículas detectables del virus en los nódulos tumorales en comparación con los tejidos pulmonares circundantes que no tenían nódulos tumorales macroscópicamente visibles (Figura 36D).

Ejemplo 21: Comparación de la actividad de NG-135 y EnAd en un modelo murino de xenoinjerto ortotópico de cáncer de ovario

Se implantaron células de carcinoma de ovario SKOV-3 que expresaban establemente luciferasa en ratones CB17-SCID mediante inyección intraperitoneal de 5e6 células/ratón. 22 días después de la implantación, los ratones fueron tratados con partículas de virus PBS (control) o 5e7 EnAd, NG-135 o NG-78 administradas por inyección intraperitoneal. Los ratones fueron fotografiados dos veces por semana usando una cámara de imagen IVIS después de la inyección intraperitoneal de 32 mg de luciferina. Las unidades de luz relativa (RLU), como una medida de la carga tumoral, se determinaron para una región fija de interés en diferentes puntos de tiempo. Los datos muestran que los virus EnAd, NG-135 y NG-78 reducen significativamente la carga tumoral en este modelo en comparación con los controles de PBS (Figura 37).

Ejemplo 22: Caracterización del virus NG-135 y del anticuerpo anti-VEGF expresado después de la producción y purificación a escala de material de virus de un biorreactor.

Las células HEK293 se descongelaron y se expandieron en matraces de agitación antes de la expansión a un volumen de trabajo de 3 L en un biorreactor de 5 L de tanque agitado (recipiente de vidrio). El controlador del biorreactor se ajustó a parámetros de 37°C, un punto de referencia de pH de 7,4, oxígeno disuelto (OD) de 50, un índice de flujo de aire de 100 mL/min y la agitación a 100 rpm. Después de equilibrar el sistema del biorreactor, se siembra un volumen inicial de medio de cultivo EX-CELL de 1,5 L con células HEK293 a una densidad celular viable de 5×10^5 células/ml y luego se expande a un volumen de trabajo de 3 L y, una vez las células se habían expandido a la densidad apropiada, el cultivo se infectó con NG-135 a una MOI de 50 ppc. 48 horas después de la infección, se recogió el cultivo de 3 L y se purificó el virus a partir de él mediante procesos previamente establecidos para la fabricación de GMP del virus EnAd (descrito a continuación) de modo que el virus NG-135 producido pudiera compararse con el virus EnAd previamente fabricado. Además de purificar el virus, el anticuerpo anti-VEGF producido por las células infectadas también se purificó a partir de los medios de cultivo celular para permitir que se realizaran análisis estructurales y funcionales para la comparación con el producto clínico de bevacizumab, Avastin.

Purificación del virus NG-135

El virus NG-135 se purificó de la cosecha del biorreactor. El material recuperado fue tratado con Benzonase® para digerir el ADN de la célula huésped y luego se concentró y se intercambió el tampón mediante filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana de fibra hueca de 500 kD. En esta etapa, el permeado de TFF, que normalmente se descartaría, se recogió y se usó para la purificación del anticuerpo anti-VEGF (véase a continuación). El material retenido con TFF concentrado, que contiene el virus NG-135, se purificó por captura selectiva y elución del virus NG-135 usando una resina de cromatografía de intercambio aniónico Sartobind. El virus

purificado se intercambi6 despu6s con tamp6n en Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, tamp6n de glicerol al 5%, se titul6 mediante HPLC y se almacen6 a -80 grados.

Caracterizaci6n del virus NG-135

5 Se compar6 la actividad oncol6tica del lote del virus NG-135 purificado (denominado NG-135-BR1) (evaluada mediante el ensayo de viabilidad celular), la replicaci6n del virus (evaluada por qPCR) y la expresi6n del anticuerpo (evaluada mediante ELISA) con EnAd o el material de referencia NG-135 anteriormente caracterizado.

Para la evaluaci6n de la potencia oncol6tica en comparaci6n con EnAd, se llev6 a cabo un ensayo de viabilidad celular seg6n los m6todos detallados en el Ejemplo 15. El NG-135-BR1 purificado mostr6 una potencia similar al material de referencia EnAd fabricado (Figura 38A).

10 Para evaluar la replicaci6n del virus o la expresi6n del anticuerpo, las c6lulas HT-29 se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 1e6 c6lulas/pocillo, se dejaron adherir y luego se infectaron con 100 ppc de EnAd, NG-135 o NG-135-BR1.

15 Para la qPCR, el ADN se recogi6 24, 48 6 72 horas despu6s de la infecci6n a partir de lisados celulares y sobrenadantes seg6n los m6todos detallados en el ejemplo 18. Las muestras de ADN extra6das se analizaron frente a los est6ndares EnAd mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda espec6fico del gen EnAd E3 de acuerdo con los m6todos detallados en el Ejemplo 9. Los genomas virales totales detectados a lo largo del curso del tiempo de la infecci6n fueron los mismos para todos los virus analizados (Figura 38B).

20 Para la evaluaci6n de la expresi6n del anticuerpo anti-VEGF, los sobrenadantes de infecci6n clarificados se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%, luego se ensayaron mediante ELISA frente a una curva patr6n de bevacizumab de acuerdo con los m6todos detallados en el Ejemplo 18. La concentraci6n de anticuerpo se determin6 por interpolaci6n a partir de la curva est6ndar (Figura 38C).

Purificaci6n de anticuerpos anti-VEGF

25 El permeado de TFF recogido, que contiene el anticuerpo monoclonal anti-VEGF, se concentr6 y se cambi6 el tamp6n en tamp6n de diafiltraci6n de Prote6na A (Na₂PO₄ 200 mM, pH 7,0) usando una segunda etapa de TFF con una membrana de fibra hueca de 30 kD. El anticuerpo concentrado fue purificado por cromatograf6a de Prote6na A con una columna de Prote6na A de 1 ml en un sistema purificador AKTA. La fracci6n de anticuerpo eluida se concentr6 usando un concentrador Amicon Ultra 50kD y se cambi6 el tamp6n en un tamp6n de almacenamiento (Tris-HCl 50 mM, glicerol al 5%, pH 7,0) utilizando una columna PD10. La concentraci6n de anticuerpo purificado se determin6 por OD- como 0,15 mg/ml y la pureza se confirm6 por SDS-PAGE.

30 Caracterizaci6n del anticuerpo anti-VEGF purificado

La estructura del anticuerpo anti-VEGF purificado se compar6 con Avastin cl6nico mediante transferencia Western despu6s de la SDS-PAGE no reducida o reducida y la afinidad del anticuerpo con VEGF se evalu6 mediante Biacore. Para la transferencia Western, se prepararon 7,5 µg/ml de Avastin o 6 µg/ml de producto de anticuerpo purificado en tamp6n de muestra NuPAGE LDS. Para geles reductores, se a6adi6 tambi6n agente reductor NuPAGE a cada muestra antes de que todas las muestras se calentaran durante 10 minutos a 70°C. La SDS-PAGE se llev6 a cabo usando 4-12% de geles Bis-Tris NuPAGE de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las prote6nas se transfirieron a membranas de PVDF mediante transferencia Western utilizando el m6dulo de transferencia Xcell II. El bloqueo y la inmunotransferencia se llevaron a cabo en PBS 0,1% de Tween-20 suplementado con 5% de leche en polvo. Se detectaron anticuerpos anti-VEGF usando IgG policlonal anti-humano conjugada con HRP (Promega, W4031). Las prote6nas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL). El anticuerpo anti-VEGF purificado producido a partir del proceso de producci6n del virus NG-135 mostr6 bandas de prote6nas detectables comparables en las transferencias no reducidas y reducidas como Avastin (Figura 38D).

45 Para el an6lisis de la afinidad de uni6n a VEGF del material de anticuerpo purificado en comparaci6n con Avastin, el material se ensay6 usando un ensayo Biacore de uni6n a VEGF validado (llevado a cabo por BioOutsource, UK). El an6lisis cin6tico (software de evaluaci6n Biacore T200) siguiendo el protocolo de ensayo defini6 demostr6 que la muestra de anticuerpo anti-VEGF purificada era capaz de unirse a VEGF165 con una cin6tica y afinidad similares al material est6ndar de referencia de Avastin (figura 38E).

Ejemplo 23: Producci6n y caracterizaci6n de virus EnAd que codifican cadenas de anticuerpos monoclonales anti-VEGF unidas por un p6ptido P2A autoescindible (NG-165)

50 El pl6smido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se us6 para generar el pl6smido pNG-165 (SEQ ID NO: 59) por inserci6n directa de un casete transg6nico que codifica un anticuerpo anti-VEGF en los sitios de restricci6n 6nicos localizados entre los genes L5 y E4. El casete transg6nico pNG-165 codifica un anticuerpo anti-VEGF mediante la inclusi6n de una secuencia de cadena VH anti-VEGF (SEQ ID NO: 29), una secuencia de cadena pesada constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 33), una secuencia de p6ptido P2A de alta eficacia de autoescisi6n (SEQ ID N6: 25), una
55 secuencia de cadena VL anti-VEGF (SEQ ID N6: 31) y una secuencia de cadena ligera constante de anticuerpo

(SEQ ID N°: 35). La secuencia de codificación del anticuerpo está flanqueada por una secuencia aceptora de corte y empalme en 5' (SEQ ID NO: 16) y una secuencia de poliadenilación en 3' (SEQ ID NO: 20). En la Figura 34 se muestra un esquema del casete transgénico insertado. La construcción del plásmido se confirmó mediante secuenciación de ADN.

5 Producción del virus

El virus NG-165 se amplificó y se purificó según los métodos usados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8.

Caracterización de virus

10 Se comparó la actividad oncolítica NG-165 (evaluada mediante el ensayo de viabilidad celular), la replicación del virus (evaluada por qPCR) y la expresión del anticuerpo anti-VEGF (evaluada por ELISA) con EnAd o NG-135 en células de carcinoma de colon. Para la evaluación de la potencia oncolítica en comparación con EnAd, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular según los métodos detallados en el Ejemplo 15. El virus NG-165 mostró una potencia similar al material de referencia EnAd fabricado (Figura 39A).

15 Para evaluar la replicación del virus o la expresión del anticuerpo, las células HT-29 se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de $1e6$ células/pocillo, se dejaron adherir y luego se infectaron con 100 ppc de EnAd, NG-135 o NG-165. Para la qPCR, el ADN se recogió a 24, 48 ó 72 horas después de la infección a partir de lisados celulares y sobrenadantes según los métodos detallados en el ejemplo 18. Las muestras de ADN extraídas se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico de gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Los genomas virales totales detectados para NG-165 a lo largo del curso del
20 tiempo de infección fueron similares al virus de referencia EnAd (Figura 39B)

Para la evaluación de la expresión del anticuerpo anti-VEGF, los sobrenadantes de infección clarificados 24, 48 ó 72 horas después de la infección se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% y luego se analizaron mediante ELISA IgG1 usando una curva estándar de bevacizumab según los métodos detallados en el Ejemplo 18. La concentración de anticuerpo IgG1 se determinó interpolando a partir de la curva estándar e indicó que NG-165
25 expresa niveles similares de IgG1 respecto al virus de referencia NG-135 (Figura 39C).

Ejemplo 24. Caracterización de los virus EnAd que codifican ScFvs anti-VEGF bajo el control de promotores endógenos o exógenos

30 Los virus NG-76 y NG-78, descritos previamente en los ejemplos 8 y 11, se caracterizaron adicionalmente por su actividad oncolítica en células de carcinoma de colon (evaluadas mediante ensayos de viabilidad celular) y por la expresión de proteína ScFv anti-VEGF funcional (evaluada mediante ELISA de unión a VEGF). Para la evaluación de la potencia oncolítica en comparación con la viabilidad de células EnAd, los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 15. Tanto NG-76 como NG-78 mostraron una potencia oncolítica similar al material de referencia de EnAd fabricado (Figura 40A y 40B).

35 Para NG-76, la actividad de unión del scFv anti-VEGF expresado bajo un promotor exógeno (CMV) se describe en el ejemplo 12. Para NG-78, la actividad de unión del scFv anti-VEGF expresado a partir del promotor tardío principal del virus endógeno se evaluó mediante ELISA directo de unión a VEGF o en un ELISA donde se incluye el producto clínico de bevacizumab para competir por la unión a VEGF. Para ambos ELISA, las células 293F se infectaron con 50ppc del virus NG-78 y se cultivaron durante 70 horas. Las células y los medios se recogieron del matraz y el sobrenadante y las células se separaron por centrifugación durante 10 minutos, 1000 rpm. El sobrenadante se
40 recogió y el sedimento celular restante se resuspendió en 1 ml de medio celular antes de llevar a cabo 3 ciclos de congelación-descongelación para lisar las células. Después de la lisis, los restos celulares y los medios se separaron mediante una segunda etapa de centrifugación y se recogió el sobrenadante del lisado. Los sobrenadantes o lisados se diluyeron 1 en 2 en BSA al 3%/PBS al 0,05% de Tween. Para el ELISA de unión directa, las muestras se diluyeron adicionalmente en serie hasta una dilución más baja de 1 en 1024. Para el ELISA de competición, a las
45 muestras se les añadió bevacizumab en concentraciones de 0, 0,05, 0,5 ó 5 $\mu\text{g/ml}$. Las placas de ELISA se recubrieron con VEGF, se bloquearon y se lavaron de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 7. Se añadieron muestras a las placas a 100 $\mu\text{l/pocillo}$ y se incubaron durante 1 h. Se detectó ScFv unido a VEGF usando anti-His policlonal conjugado con HRP (Abcam ab1187) seguido de detección de TMB. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de placas y se representa gráficamente la absorbancia substraída para la unión directa de las
50 muestras a VEGF (figura 40C) y la unión directa en presencia de concentraciones crecientes de bevacizumab (figura 40D). Como se demostró previamente para NG-76, el ScFv anti-VEGF funcional que se une específicamente a VEGF165 se puede expresar y secretar a partir de células infectadas con NG-78.

Ejemplo 25. Caracterización de la actividad del virus NG-76 en comparación con EnAd en ratones portadores de tumores

55 Se implantaron células de carcinoma de colon DLD como un xenoinjerto subcutáneo en ratones CD1 nu/nu. Una vez que los tumores alcanzaron $\sim 100 \text{ mm}^3$, se agruparon los ratones y se trataron con $5e9$ partículas de virus EnAd o NG-76 administradas por inyección intratumoral única. En cada estudio, también se incluyó un grupo de ratones

control no infectados. Los tumores DLD se extirparon el día 7 después del tratamiento y se evaluó la replicación del virus (por qPCR) y la expresión del gen del virus o ScFv anti-VEGF (mediante RTqPCR).

Análisis de la replicación del genoma del virus por qPCR

- 5 Los tumores extirpados se pesaron, se homogeneizaron y se extrajo el ADN de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 13. Las muestras extraídas y los estándares se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico de gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos de qPCR detallados en el Ejemplo 9. La cuantificación del número de genomas víricos por tumor se muestra para tumores DLD el día 7 post-tratamiento y demuestra que NG-76 y EnAd tienen una replicación del virus significativa por encima de la entrada (Figura 41A).

Análisis de la expresión génica del anticuerpo ScFv viral (hexón) o anti-VEGF mediante RTqPCR

- 10 Se preparó ADNc a partir del ARN de tumores extirpados de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 13. La cuantificación del número de copias de cDNA detectadas por qPCR demostró una expresión comparable del gen tardío del virus, hexón, en los tumores DLD tratados con NG-76 o EnAd el día 7 después del tratamiento (figura 41B). Por el contrario, la expresión del gen ScFv anti-VEGF solo se detectó en células DLD tratadas con el virus NG-76 (Figura 41C).
- 15 Ejemplo 26: Selectividad de expresión en células o tumores de transgenes codificados por virus utilizando promotores endógenos o exógenos (NG-135, NG-47, NG-61, NG-63 y NG-107)

La expresión del anticuerpo NG-135 depende de la replicación del virus

- 20 El casete del anticuerpo anti-VEGF en el virus NG-135 está codificado bajo el control del promotor principal tardío endógeno de EnAd (MLP). Se ha caracterizado previamente que, durante la infección por adenovirus, la mayoría de la expresión génica del promotor tardío principal depende de la replicación del virus. Para demostrar que la expresión del anticuerpo cuando está controlada por EnAd MLP también depende, por tanto, de la replicación del virus, la cinética de la replicación del virus NG-135 (evaluada por qPCR) y la expresión del anticuerpo (evaluada por ELISA) se compararon con diferentes MOI.

- 25 Las células de carcinoma de colon HT-29 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de $2e6$ células/pocillo. 18 horas después de sembrar las células se infectaron con 1, 10 ó 100 ppc de virus NG-135.

Para la evaluación de la expresión del anticuerpo anti-VEGF, los sobrenadantes de infección clarificados 24, 48 ó 72 horas después de la infección se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% y luego se analizaron mediante ELISA de unión a anti-VEGF, según los métodos detallados en el ejemplo 9. La concentración de anticuerpo se determinó por interpolación a partir de la curva estándar.

- 30 Para el análisis de la replicación del virus por qPCR, el ADN se recogió a 24, 48 ó 72 horas después de la infección a partir de lisados celulares y sobrenadantes según los métodos detallados en el ejemplo 9. Las muestras de ADN extraídas se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico de gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 9. El análisis de la expresión del anticuerpo 72 horas después de la infección muestra un anticuerpo secretado detectable para todas las MOI probadas, pero el nivel de expresión del anticuerpo depende de la MOI de entrada (Figura 42A). La cinética de expresión del anticuerpo muestra que la expresión del anticuerpo aumenta a lo largo de la infección, pero la expresión detectable del anticuerpo se asocia con un nivel significativo de replicación del virus por encima de la entrada (Figuras 42B y 42C).
- 35

Expresión de anticuerpos NG-135 en carcinoma, fibroblastos estromales y células primarias

- 40 Para confirmar que el anticuerpo puede expresarse selectivamente en células permisivas a la infección por NG-135 y la replicación del virus, la replicación del virus NG-135 (evaluada por qPCR), la expresión de anticuerpos (evaluada por ELISA) y la capacidad de producir partículas virales infecciosas (evaluadas por ensayo de infección) se determinó en células cancerosas (HT-29) que se sabe que son permisivas para la infección por EnAd y las células de fibroblastos (WI-38 y MRC-5) previamente caracterizadas como no permisivas. Brevemente, las células se sembraron en placas de 12 pocillos y se infectaron 18 horas después de la siembra con 100 ppc de virus NG-135 durante 4 horas antes de que los medios de infección se eliminaran de las células y se reemplazaran con medios de cultivo. A 1 h o a las 72 horas después del período de infección de 4 h, los sobrenadantes celulares y los lisados se recogieron de las placas de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 18. Para la qPCR, se extrajo ADN y las muestras se analizaron usando un conjunto de cebador-sonda específico de gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Para la evaluación de la expresión del anticuerpo anti-VEGF, los sobrenadantes de infección clarificados después de la infección se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% y luego se ensayaron mediante ELISA según los métodos detallados en el Ejemplo 18.
- 50

- 55 Para la evaluación de la producción de partículas de virus infecciosas, los sobrenadantes recuperados se diluyeron en serie 10 veces a partir de cultivos puros para volver a infectar cultivos nuevos de células HT-29 sembradas a una densidad de $3e4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se retiraron los medios de las placas 72 horas después de la reinfección y las células se fijaron con Me:Ac durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron

luego con PBS y las células se tiñeron para la expresión de la proteína de la cápsida EnAd mediante incubación con anticuerpo primario anti-hexón de conejo (diluido 1 en 800) y luego anticuerpo de detección anti-conejo acoplado a HRP secundario. La proteína hexón se visualizó mediante la adición de sustrato DAB y formación de imágenes utilizando microscopía óptica. El título infeccioso (TCID₅₀/ml) se determinó marcando todos los pocillos que

5 contenían tinción con proteína de cápsida positiva.

El análisis de los datos reveló que solo las células HT-29 mostraban la replicación del virus NG-135 por encima de los niveles de entrada de infección (Figura 43A) o la expresión de anticuerpo detectable (Figura 43B). Usando la información de sensibilidad del ensayo IgG1 ELISA, la falta de expresión de anticuerpos detectables por células no tumorales indica que estas células produjeron menos de 0,33 fg/célula/24 h en comparación con niveles de más de

10 100 fg/célula/24 h para células tumorales HT-29. Estos datos se correlacionaron con la producción extensiva de partículas de virus infecciosas en células tumorales HT-29 pero sin producción detectable de virus en las líneas celulares de fibroblastos (Figura 43C).

Expresión selectiva de transgenes en células inmunes primarias

15 La expresión selectiva de transgenes en células inmunes innatas primarias se caracterizó por los virus EnAd, NG-47 y NG-107, que expresan el gen indicador, eGFP, bajo el control de un promotor exógeno (CMV) o MLP endógeno, respectivamente. La caracterización del virus NG-47 y NG-107 se detalla en el ejemplo 14.

Los monocitos se aislaron de sangre completa y se cultivaron para diferenciarlos en células dendríticas de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 28. En el día 5 de cultivo, se sembraron células dendríticas derivadas de monocitos diferenciados en placas de 96 pocillos y se expusieron a 200 ppc de EnAd, NG-47 o NG-107 o se dejaron

20 sin tratar. Después de 48 horas, las células se recogieron de los pocillos, se lavaron y se marcaron con anticuerpo anti-CD83 conjugado con PE/Cy5 (CD83-PE/Cy5 (BioLegend)). La expresión de CD83 y eGFP en las DC se evaluó luego mediante citometría de flujo (Applied Biosystems) y los datos se analizaron usando el software FlowJo. La expresión de GFP solo se pudo detectar en células expuestas a NG-47 donde la expresión de eGFP está bajo el promotor de CMV exógeno que no depende de la replicación viral para la expresión génica (Figura 44).

25 Expresión selectiva de transgenes en modelos in vivo

Para investigar la selectividad de la expresión transgénica in vivo, se usaron virus indicadores para determinar la expresión transgénica en tumores de células de carcinoma murino que se sabe que no son permisivos para la replicación del virus EnAd. La expresión transgénica y la respuesta inmune funcional al transgén, virus o tumor se

30 evaluaron cuando la expresión transgénica estaba bajo el control de un promotor exógeno (CMV) o el MLP endógeno.

Los virus indicadores NG-61 y NG-63, que expresan la proteína luminiscente, luciferasa, se describieron y caracterizaron previamente en el Ejemplo 14. Se implantaron ratones BALB/c con 1e⁶ células de carcinoma de colon murino (CT26) por vía subcutánea en su extremidad. Una vez que se alcanzó un tamaño medio de

35 aproximadamente 100 mm³, los tumores se inyectaron con 2,5e⁹ partículas de NG - 61 o NG - 63. Se obtuvieron imágenes de los ratones regularmente durante 14 días después del tratamiento utilizando una cámara de imágenes IVIS después de la inyección intraperitoneal de 32 mg de luciferina. Las regiones de interés de un tamaño fijo se dibujaron alrededor de los tumores para permitir la medición de unidades de luz relativa (RLU) para cada tumor.

También se obtuvieron imágenes de los ratones portadores de tumores no tratados para determinar el fondo de formación de la imágenes. La cuantificación de la expresión transgénica a través de los grupos de tratamiento

40 demostró que la luciferasa solo era detectable en tumores tratados con el virus NG-61, en el que la luciferasa está bajo el control del promotor de CMV exógeno (Figura 45A). En el día 14 posterior al tratamiento, se extirparon y se disociaron los bazo de los ratones. Se inmovilizó un anticuerpo anti-interferón gamma en placas de PVDF.

Esplenocitos y estímulos, ya sea del virus EnAd, lisados de células CT26 o proteína de luciferasa recombinante digerida con tripsina, se añadieron a las placas de PVDF y se incubaron durante la noche. Después, las placas se

45 lavaron y se incubaron con un anticuerpo anti-interferón gamma marcado con biotina antes de lavarse de nuevo y se incubaron con un conjugado de estreptavidina-ALP. Después, las placas se lavaron, se añadió el sustrato BCIP/NBT y luego se dejaron las placas desarrollarse hasta que se pudieron ver distintos puntos. Las placas se lavaron

50 nuevamente y luego se secaron antes de llevar a cabo el análisis en CTL Europe, Alemania. La cuantificación reveló que los esplenocitos de ratones tratados con NG-61 pero no con NG-63 mostraban respuestas específicas al transgén de luciferasa (Figura 45B). Este resultado se correlacionó con el aumento de respuestas en ratones tratados con NG-61 tanto para el virus EnAd como para las células tumorales CT26 (Figuras 45C y 45D).

Ejemplo 27: Producción y caracterización de virus EnAd que codifican anticuerpos (NG-190, NG-177) o variantes de anticuerpos ScFv (NG-221) en la proteína de la ruta del inhibidor del punto de control inmune PD-L1

55 El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se usó para generar los plásmidos pNG-177 (SEQ ID NO: 46, descrito en el ejemplo 16), pNG-190 (SEQ ID NO: 60), y pNG-221 (SEQ ID NO: 61) por inserción directa de casetes transgénicos que codifican el anticuerpo anti-PD-L1 (YW243) o ScFv anti-PD-L1 del anticuerpo YW243, en los sitios de restricción únicos localizados entre los genes L5 y E4. El casete transgénico pNG-177 codifica un anticuerpo anti-PD-L1 mediante la inclusión de una secuencia de cadena VH anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 30), una secuencia de cadena

pesada constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 34), una secuencia interna secuencia de entrada al ribosoma (SEQ ID NO. 19), una secuencia de cadena VL anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 32) y una secuencia de cadena ligera constante del anticuerpo (SEQ ID NO: 35). El casete transgénico pNG-190 codifica un anticuerpo anti-PD-L1 mediante la inclusión de una secuencia de cadena VH anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 30), una secuencia de cadena pesada constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 34), una secuencia del péptido P2A de alta eficacia de autoescisión (SEQ ID N°: 25), una secuencia de cadena VL anti-PD-L1 (SEQ ID N°: 32) y una secuencia de cadena ligera constante del anticuerpo (SEQ ID N°: 35). El casete transgénico pNG-221 codifica un ScFv anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 37). Las secuencias que codifican el anticuerpo o ScFv están flanqueadas por una secuencia aceptora de empalme corto 5' (SEQ ID NO: 16) y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 20). Los esquemas de los casetes transgénicos insertados se muestran en la Figura 34. La construcción de los plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN.

Producción de virus

Los virus NG-190 y NG-221 se amplificaron y purificaron de acuerdo con los métodos usados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8.

Caracterización del virus

Se comparó la actividad oncolítica NG-190 y NG-221 (evaluada por el ensayo de viabilidad celular), la replicación del virus (evaluada por qPCR) y el anticuerpo anti-PD-L1 o la expresión de ScFv en células de carcinoma de colon (evaluado por ELISA) con el virus de referencia EnAd o los virus NG-165 y NG-135 que se han caracterizado previamente y expresan anticuerpos anti-VEGF. Para la evaluación de la potencia oncolítica en comparación con EnAd, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular según los métodos detallados en el Ejemplo 15. Los virus NG-190 y NG-221 mostraron una actividad oncolítica similar a EnAd (Figura 46A,B).

Para evaluar la replicación del virus o la expresión del anticuerpo, se sembraron células HT-29 en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/pocillo y después de adherirse infectadas con 100 ppc de EnAd, NG-190, NG-221 o NG-165. Para la qPCR, el ADN se recogió a 24, 48 ó 72 horas después de la infección a partir de los lisados celulares y sobrenadantes según los métodos detallados en el ejemplo 18. Las muestras de ADN extraídas se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico del gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Los genomas virales totales detectados para NG-190 (Figura 46C) o NG-221 (Figura 46D) fueron similares al virus de referencia EnAd a lo largo del curso del tiempo de la infección.

Para la evaluación de la expresión de anticuerpos secretados a partir de células NG-190 o NG-165 infectadas, los sobrenadantes de infección clarificados recuperados 24, 48 ó 72 horas después de la infección se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% y luego se analizaron mediante ELISA de IgG1 anti-humano, según los métodos detallados en el Ejemplo 18. De forma similar, la expresión del anticuerpo secretado de las células infectadas con NG-177 o NG-135 se evaluó en sobrenadantes clarificados 72 horas después de la infección. La concentración de anticuerpo en las muestras se determinó interpolando a partir de la curva patrón del ensayo y demostró que el anticuerpo detectable se secreta a partir de células infectadas con NG-190 a niveles comparables al virus comparador NG-165 (Figura 47A) y de células infectadas con NG-177 a niveles comparables al virus comparador NG-135 (Figura 49A).

Ejemplo 28: Caracterización del anticuerpo anti-PD-L1 o ScFv expresado a partir de células NG-190, NG-177 o NG-221 infectadas

Ensayo de unión directa de PD-L1

La actividad de unión anti-PD-L1 del anticuerpo o ScFv expresada a partir de células infectadas con NG-190 y NG-221 se evaluó mediante ELISA de unión directa a PD-L1.

Se infectaron células de carcinoma de pulmón A549 durante 72 horas con 100 ppc de NG-190, NG-221 o el virus de control NG-165. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se concentraron a 300 g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes de cultivo se concentraron a continuación 10 veces mediante centrifugación en una columna de centrifugación concentradora de proteínas MWCO de 9 K (Pierce, 87748) durante 20 minutos a 4000 g. Se recubrieron placas ELISA (microplaca NunC Immuno MaxiSorp de 96 pocillos) con PDL1-Fc recombinante (0,5 µg/ml, R&D Systems, 156-B7-100) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 al 0,05% y luego se bloquearon con PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%. Se prepararon diluciones dobles en serie de sobrenadantes concentrados en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% en un intervalo de 1 en 2 a 1 en 2048, luego se añadieron a la placa de ELISA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para las muestras NG-190 y NG-165, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 al 0,05%, luego se añadieron 50 µl de anticuerpo de cadena ligera anti-Kappa 1/8000 (Abcam, ab124727) a todos los pocillos. Después de la incubación durante 1 hora y el lavado, se llevó a cabo la detección secundaria usando IgG de cabra anti-conejo H&L (HRP) (Abcam, ab6721). La placa se desarrolló luego mediante la adición de 50 µl/pocillo de solución de sustrato Ultra TMB-ELISA de 1 paso (Thermo, 34028). Después de 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se midió y representó la absorbancia a 450 nm. La actividad de unión anti-PD-L1 pudo detectarse específicamente en los sobrenadantes de células A549 infectadas con NG-190 pero no con células A549

infectadas con NG-165 (Figura 47B).

Para las muestras de NG-221, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 al 0,05% y luego se añadieron 50 µl de anticuerpo His tag® Anti-6X 1:5000 (HRP) (Abcam, ab1187) a todos los pocillos durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavó. La placa se desarrolló mediante la adición de 50 µl de solución de sustrato TMB-ELISA Ultra-1-Paso (Thermo, 34028). Después de 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. La actividad de unión de ScFv anti-PD-L1 pudo detectarse específicamente en los sobrenadantes de NG-221 (Figura 47C).

Ensayo de inhibición de unión al receptor PD-L1

La actividad de bloqueo del anticuerpo anti-PD-L1 expresado en el sobrenadante de las células infectadas con NG-190 o NG-177 se evaluó en un ensayo de interacción del ligando PD-L1:receptor PD-1.

Se infectaron células 293 durante 72 horas con 100 ppc de NG-190 o NG-177. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se concentraron de acuerdo con el método detallado anteriormente. Las placas de ELISA se recubrieron con PDL1-Fc (2 µg/ml, R&D Systems, 156-B7-100) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS y luego se bloquearon con PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% durante una hora a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones dobles en serie de sobrenadantes concentrados en PBS y luego se añadieron 45 µl de cada dilución a la placa de ELISA. Se añadieron 10 ng de PD1-Fc recombinante (R&D Systems, 1086-PD-050) a cada pocillo y la placa se incubó durante 1 hora. Todos los pocillos se lavaron entonces tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% y se bloquearon durante 10 minutos con PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%. A continuación, se añadió anticuerpo purificado por afinidad biotinilado a PD-1 humano (R&D Systems, BAF1086) a los pocillos a 0,4 µg/ml durante 1 hora. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% antes de la adición de una dilución 1:200 de estreptavidina-HRP (R&D Systems, DY998) durante 1 hora. La placa se desarrolló mediante la adición de 50 µl de solución de sustrato ultra TMB-ELISA de 1-paso (thermo, 34028). Después de 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Para determinar el porcentaje de unión de PD-1, los valores de absorbancia medidos se expresaron como un porcentaje de las muestras de control que no contenían anticuerpo anti-PD-L1. El anticuerpo anti-PD-L1 secretado a partir de células infectadas con NG-190 fue capaz de inhibir la unión al receptor PD-1 de una manera dependiente de la dosis (Figura 47D). Del mismo modo, el sobrenadante puro de NG-177, pero no las células infectadas con NG-135, fue capaz de inhibir la unión del receptor de PD-1 a PD-L1 en > 50% (Figura 49B).

Reacción mixta de linfocitos (MLR)

La actividad funcional del anticuerpo anti-PD-L1 expresado en el sobrenadante de las células infectadas con NG-190 o NG-177 se evaluó mediante el grado de activación de las células T en una reacción de linfocitos mixtos. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre humana fresca (Clinical Trials Laboratory Services) por centrifugación de sangre diluida 1:2 en 13 ml de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare life sciences, 17-1440-02) a 1300 rpm durante 30 días. Se aislaron monocitos CD14+ usando microperlas CD14 humanas (Miltenyi, 130-050-201) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Los monocitos aislados se cultivaron en RPMI 1640 (life technologies, 11875-093) complementado con L-glutamina 2 mM (GE Healthcare: M11-003), piruvato de sodio 1 mM (GE Healthcare: S11-003), aminoácidos no esenciales 1 mM (GE Healthcare: M11-004), 1 mM pen/estrep (GE Healthcare: P11-010) y FBS al 10% (Thermo fisher, SV30160.03) 500 U/ml de IL-4 (R&D Systems, 204-IL-050) y 800 U/ml de GM-CSF (R&D Systems, 215-GM-050). Los cultivos se alimentaron cada 2 días reemplazando la mitad del volumen de cultivo con medio nuevo.

Las células dendríticas derivadas de monocitos se maduraron el día 5 del cultivo mediante la adición de 1 µg/ml de LPS (Sigma-Aldrich, L2654) durante 24 horas. Las células se usaron para el ensayo de MLR en el día 6. Se aislaron células T CD4+ a partir de PBMC (aisladas como se describió anteriormente) usando un kit de aislamiento de células T CD4+ humano (Miltenyi, 130-096-533) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Las células T CD4+ aisladas se usaron en MLR el día del aislamiento.

Para la MLR, se mezclaron 1e5 células T CD4+ aisladas por pocillo con 2e4 células dendríticas derivadas de monocitos LPS-maduras y luego el anticuerpo de control positivo anti-PD-L1 (5 µg/ml, Biolegend 329716) o 20 µl de sobrenadantes concentrados (preparado arriba) se agregaron a los pozos de prueba. La MLR se incubó durante 4 días a 37°C. Los sobrenadantes se eliminaron de la placa, se clarificaron y luego se analizaron para detectar la citoquina IL-2 mediante ELISA. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con mAb IL-2 humano (R&D Systems, MAB602) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS y luego se bloquearon con PBS/BSA al 3%/Tween al 0,05% durante una hora a temperatura ambiente. Se preparó una curva estándar de IL-2 a partir de la proteína IL-2 recombinante (R&D Systems, 202-IL-050) en un intervalo de 2000 pg/ml a 31,3 pg/ml. Las muestras MLR se prepararon diluyendo sobrenadantes clarificados preparados por encima de 1 en 4 en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%. Se agregaron muestras y patrones a 50 µl/pocillo a las placas ELISA durante 1 h a TA, luego se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% antes de la adición del anticuerpo de detección IL-2 anti-humano biotinilado (R&D Systems, BAF202). Después de 1 hora de incubación, la placa se lavó tres veces más con PBS/Tween 20 al 0,05% y se añadió una dilución 1:200 de estreptavidina-HRP (R&D Systems, DY998) durante 1 hora. La placa se desarrolló mediante la adición de 50 µl de solución de sustrato Ultra TMB-ELISA de 1-paso

(thermo, 34028). Después de 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Para dos conjuntos de donadores de células CD:T diferentes de experimentos independientes, se pudieron detectar respuestas de células T CD4 potenciadas, en términos de aumento de la expresión de IL-2, para sobrenadantes de cultivos infectados con NG-190 pero no para NG-165 (Figura 48A y 48B). De forma similar, las respuestas de las células T CD4 también se potenciaron para los sobrenadantes de cultivos NG-177 pero no NG-135 (Figura 49C). En conjunto, estos datos demuestran que el anticuerpo anti-PD-L1 funcional se produce en el contexto de la infección de células tumorales para los virus armados NG-190 y NG-177.

Unión celular del ligando PD-L1

La actividad de unión anti-PD-L1 del anticuerpo expresado a partir de células infectadas con NG-177 se evaluó por su capacidad para unirse directamente al ligando PD-L1 no recombinante expresado en un entorno de membrana en la superficie de células de carcinoma de pulmón (A549).

Las células A549 se estimularon con 50 ng/ml de IFN γ humano para promover la regulación positiva de la expresión de PD-L1 en la superficie celular o se dejaron sin estimular. Después de 24 horas, las células se tripsinizaron y se incubaron durante 1 hora a 4°C solo con medio, o 50 µl de sobrenadante celular infectado con NG-177 concentrado o NG-135 (preparado anteriormente). Las células se lavaron dos veces con PBS/BSA al 1% antes de la incubación durante 30 minutos a 4°C con 50 µl de IgG (H+L) antihumana de cabra marcada Alexa Fluor 488 (Life Technologies, A11013) diluida 1 en 250. Las células se lavaron de nuevo, se resuspendieron en PBS/BSA al 1% y se analizaron con un citómetro de enfoque acústico Attune (Life Technologies). La actividad de unión de PD-L1, que era similar a la unión de un anticuerpo de control anti-PD-L1 purificado marcado con PE (29E.2A3 de Biolegend), se pudo detectar en sobrenadantes de NG-177, pero no se detectó en los sobrenadantes del virus NG-135 control (Figura 50).

Ejemplo 29: Producción y caracterización de los virus EnAd que codifican anticuerpos para la proteína CTLA-4 de la vía inhibitoria del punto de control inmunitario (NG-242)

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar el plásmido pNG-242 (SEQ ID NO: 58) por inserción directa de casetes transgénicos que codifican un anticuerpo anti-CTLA-4 (11.2.1) en los sitios de restricción únicos localizados entre los genes L5 y E4. El casete transgénico pNG-242 codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 mediante la inclusión de una secuencia de cadena VH anti-CTLA-4 (SEQ ID NO: 70), una secuencia de cadena pesada constante de anticuerpo (SEQ ID NO: 33), una secuencia de entrada al ribosoma interno (SEQ ID NO: 19), una secuencia de cadena VL anti-CTLA-4 (SEQ ID NO: 71) y una secuencia de cadena ligera constante del anticuerpo (SEQ ID NO: 35). Un esquema de los casetes transgénicos insertados se muestra en la Figura 34. La construcción del plásmido se confirmó mediante secuenciación de ADN.

Producción de virus

El virus NG-242 se amplificó y purificó según los métodos utilizados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8.

Caracterización de los virus

La actividad oncolítica de NG-242 (evaluada por el ensayo de viabilidad celular) y la expresión del anticuerpo anti-CTLA-4 (evaluado por ELISA) se comparó en células de carcinoma de colon con virus de referencia EnAd o con virus de referencia NG-135 que expresan anticuerpos anti-VEGF. Para la evaluación de la potencia oncolítica en comparación con EnAd, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular según los métodos detallados en el Ejemplo 15. El virus NG-242 mostró una potencia comparable al material de referencia EnAd fabricado (Figura 51A).

Para la evaluación de la expresión del anticuerpo, se sembraron células HT-29 en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 1e6 células /pocillo y después de adherirse se infectaron con 100 ppc de EnAd, NG-242 o NG-135. Los sobrenadantes de infección recogidos a 24, 48 ó 72 horas después de la infección se diluyeron en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% y luego se analizaron mediante ELISA IgG1 antihumano de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 18. La concentración de anticuerpo en las muestras se determinó interpolando a partir de la curva patrón del ensayo y demostró que el anticuerpo detectable se secreta a partir de células infectadas con NG-242 a niveles similares al virus comparador NG-135 (Figura 51B).

Ensayo de unión directa de CTLA-4

La actividad de unión anti-CTLA-4 del anticuerpo expresado a partir de células infectadas con NG-242 se evaluó mediante ELISA de unión directa a CTLA-4.

Las células A549 se infectaron durante 72 horas con 100 ppc del virus control NG-242 o NG-165, que expresa un anticuerpo de IgG1 anti-VEGF. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se concentraron a 300 g durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Las placas de ELISA se recubrieron con CTLA4-Fc recombinante (0,5 µg/ml, R&D Systems, 325-CT-200) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% y luego se bloquearon con PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%. Se prepararon diluciones dobles en serie de

sobrenadantes concentrados en PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% de 1 en 2 a 1 en 2048, luego se añadieron a la placa de ELISA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Este ELISA se procesó entonces según los métodos para detectar la unión de PD-L1 detallada en el ejemplo 28. La actividad de unión anti-CTLA-4 pudo detectarse específicamente en los sobrenadantes de las células A549 infectadas con las células NG-242 pero no con las células A549 infectadas con NG-165 (Figura 51C).

Ensayo de inhibición de unión del receptor CTLA-4

La actividad de bloqueo del anticuerpo anti-CTLA-4, expresada en el sobrenadante de las células infectadas con NG-242, se evaluó en un ensayo de interacción del ligando CTLA-4:receptor B7-1.

Los sobrenadantes del cultivo de las células infectadas con NG-242 descritos anteriormente se recogieron y se concentraron de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 28. Las placas de ELISA se recubrieron con CTLA4-Fc (2 µg/ml, R&D Systems, 325-CT-200) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS y luego se bloquearon con PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05% durante 1 hora a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones dobles en serie de sobrenadantes concentrados en PBS y luego se añadieron 45 µl de cada dilución a la placa de ELISA. Se añadieron 10 ng de B7-1-Fc recombinante (R&D Systems, 140-B1-100) a cada pocillo y la placa se incubó durante 1 hora. Todos los pocillos se lavaron tres veces con PBS/Tween 20 al 0,05% y luego se bloquearon durante 10 minutos con PBS/BSA al 3%/Tween 20 al 0,05%. Se añadieron 2 µg/ml de anticuerpo B7-1 antihumano biotinilado (R&D Systems, BAM-402) y la placa se incubó durante 1 hora. Se llevaron a cabo tres lavados y luego se añadió una dilución 1:200 de estreptavidina-HRP (R&D Systems, DY998). La placa se desarrolló mediante la adición de 50 µl de solución de sustrato Ultra TMB-ELISA de 1-paso (thermo, 34028). Después de 20 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 1 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Los resultados se analizaron dividiendo la absorbancia de la muestra por la del control (sin inhibidor de prueba) y multiplicando por 100 para determinar el porcentaje máximo de B7-1 unido. El anticuerpo anti-CTLA-4 secretado a partir de células infectadas con NG-242 fue capaz de inhibir la unión al receptor B7-1 (Figura 51D).

Ejemplo 30: Producción y caracterización de virus EnAd que codifican antígenos asociados a tumores (TAA) (NG-217, NG-220)

El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se utilizó para generar los plásmidos pNG-217 (SEQ ID NO: 57), pNG-220 (SEQ ID NO: 56) por inserción directa de casetes transgénicos que codifican el antígeno asociado al tumor, NY-ESO-1 en los sitios de restricción únicos ubicados entre los genes L5 y E4. El casete transgénico pNG-217 codifica el gen NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 43) flanqueado por una secuencia promotora de CMV (SEQ ID NO: 13) y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 20). El casete transgénico pNG-220 codifica el gen NY-ESO-1 flanqueado por una secuencia del promotor PGK (SEQ ID NO: 14) y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 20). Los esquemas de los casetes transgénicos insertados se muestran en la Figura 34. La construcción de los plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN.

Producción de los virus

Los virus NG-217 y NG-220 se amplificaron y purificaron de acuerdo con los métodos utilizados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8.

Caracterización de los virus

La replicación del virus NG-220 y NG-217 (evaluada por qPCR) y la expresión transgénica de NG-220 NY-ESO-1 en células de carcinoma de colon (evaluadas mediante transferencia Western) se comparó con EnAd. Para la evaluación de la replicación del virus, las células HT-29 se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 1e6 células/pocillo y después de adherirse infectadas con 100 ppc de EnAd, NG-220 o NG-217. Para la qPCR, el ADN se recogió a 24 ó 48 post-infección tanto de lisados celulares como de sobrenadantes de acuerdo con los métodos detallados en el ejemplo 18. Las muestras de ADN extraídas se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico de gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Los genomas virales totales detectados para NG-220 (Figura 52A) o NG-217 (Figura 52B) fueron similares al virus de referencia EnAd.

Para la evaluación de la transferencia Western de la expresión de NY-ESO-1, se sembraron células HT-29 en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 4e6 células/pocillo y se incubaron durante 5 horas a 37°C, 5% de CO₂. Las células se infectaron luego durante 48 ó 72 horas con 100 partículas de virus NG-220 o EnAd por célula. Se retiró el medio de los pocillos y las células se lavaron una vez con PBS antes de la lisis en 250 µl de tampón de lisis (NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,5%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)) que contenía cóctel III de inhibidor de proteasa (Calbiochem: 539134). Los lisados se trataron con benzonasa para degradar el ADN genómico y se diluyeron adicionalmente 1:4 en tampón de lisis que contenía tampón de muestra NuPAGE LDS y agente reductor NuPAGE (Life Technologies). Las muestras se calentaron durante 10 minutos, 70°C antes de llevar a cabo la SDS-PAGE usando 4-12% de geles Bis-Tris NuPAGE (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF mediante transferencia Western utilizando el módulo de transferencia Xcell II (Life Technologies). El bloqueo y la inmunotransferencia se llevaron a cabo en PBS 0,1% de Tween-20 suplementado con 5% de leche en polvo y todas las etapas de lavado se llevaron a cabo en PBS 0,1% de

Tween-20. Se detectó NY-ESO-1 usando anticuerpo monoclonal de ratón anti-NY-ESO-1 (3 µg/ml) y se llevó a cabo la detección secundaria de anticuerpos usando IgG-HRP anti-ratón de conejo. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia potenciada. La expresión de NY-ESO-1 fue detectable tanto a las 48 como a las 72 horas después de la infección con NG-220 pero no con el control de EnAd (Figura 52B).

- 5 Ejemplo 31: Construcción de un plásmido de clonación de EnAd, pEnAd2.4, para la inserción de casetes transgénicos cadena abajo del gen L5, Fibra.

El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se obtuvo por recombinación homóloga entre un vector lanzadera, lanzadera pEnAd2.4, y el genoma EnAd. El plásmido pEn2.4 contiene un origen de replicación p15A bacteriano, un gen de resistencia a la kanamicina y el genoma EnAd con sitios de restricción únicos insertados en la región B_γ.

- 10 La construcción del plásmido pColoAd2.4 fue la siguiente. Un plásmido lanzadera de ~12kb, lanzadera pColoAd1, se construyó inicialmente con el fin de que se pudieran introducir sitios de restricción únicos en el gen tardío, L5, región del genoma EnAd (región B_γ). Los extremos 5' (nt 1-4632) y 3' (nt 27837-32326) de EnAd se amplificaron a partir del genoma EnAd mediante PCR usando el cebador 5'- TTGGCGGCGCGCCTATCTATATAATATAACC-3' [SEQ ID NO: 80] y los cebadores 5'-AATGCAAATCTGTG AGGGG-3' [SEQ ID NO: 82] o 5'-CTTAGTGTTGTTGTG GTATTGG-3' [SEQ ID NO: 83] respectivamente. El producto de PCR del brazo 5' contenía un sitio Ascl introducido en 5' y un sitio PspOMI 3' que corresponde al sitio PspOMI en nt 4626 en el genoma EnAd. El producto de PCR del brazo 3' contenía un sitio PspOMI de 5' que corresponde al sitio PspOMI en el nt 27837 en el genoma EnAd y un sitio Ascl 3' introducido. Los productos de PCR se digirieron por restricción con Ascl/PspOMI y se ligaron en una ligación de tres vías en una etapa en un plásmido linealizado Ascl que contenía un origen de replicación p15A y un casete de resistencia a la kanamicina. Esto generó el plásmido lanzadera pEnAd. Un fragmento de ADN correspondiente a la región del genoma EnAd que está flanqueado por los sitios de restricción PspOMI y AclI y contiene el gen tardío, L5 (nt 27837-30060) se sintetizó con una región añadida de 19bp 5'-GCGATCGCTACCCTGCAGG-3' [SEQ ID NO: 90] insertada en la posición correspondiente a EnAd nt 29356 en la región B_γ. Esta región adicional incluyó sitios de restricción para dos enzimas que no están presentes en el genoma EnAd (GCGATCGC y CCTGCAGG), y se pueden cortar mediante SgfI y SbfI. El fragmento de ADN sintetizado se digirió por restricción con las enzimas PspOMI y AclI y se clonó en la región correspondiente en el plásmido lanzadera pColoAd1 digerido con PspOMI/AclI para crear el plásmido, lanzadera pColoAd2.4. Para obtener el plásmido pColoAd2.4 por recombinación homóloga, el plásmido lanzadera pColoAd2.4 se linealizó mediante digestión de restricción con la enzima PspOMI y se trató con fosfatasa alcalina para eliminar 5' fosfatos. El plásmido linealizado y el genoma EnAd se co-transformaron en células BJ5183 por electroporación de acuerdo con el protocolo del fabricante y la generación del plásmido pColoAd2.4 por recombinación homóloga se determinó por digestión de restricción. La construcción correcta de todos los plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN.
- 15
20
25
30

Ejemplo 32: Síntesis de un plásmido de clonación EnAd, pColoAd2.6, para la inserción de casetes transgénicos cadena arriba o cadena abajo del gen L5, Fibra.

- 35 El plásmido pColoAd2.6 (pNG-185, SEQ ID NO: 65) se generó por métodos de ensamblaje de segmentos de genes sintéticos mediante SGI-DNA (La Jolla, CA, EE.UU.). La construcción correcta del plásmido se confirmó usando la secuenciación de próxima generación (SGI-DNA). El plásmido pNG-185 contiene un origen de replicación p15A bacteriano, un gen de resistencia a la kanamicina y el genoma EnAd con sitios de restricción únicos insertados en las regiones B_x y B_γ.

- 40 Producción de virus

El virus NG-185 se amplificó y se purificó según los métodos usados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8.

Caracterización del virus

- 45 Se comparó la actividad oncolítica de NG-185 (evaluada mediante el ensayo de viabilidad celular) y la replicación del virus (evaluada por qPCR) con el virus de referencia EnAd. Para la evaluación de la potencia oncolítica en comparación con EnAd, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular según los métodos detallados en el Ejemplo 15. El virus NG-185 mostró actividad oncolítica similar a EnAd (Figura 53A).

- 50 Para la evaluación de la replicación del virus, se sembraron células HT-29 en placas de cultivo de 12 pocillos a una densidad de 1e6 células/pocillo y después de adherirse se infectaron con 100 ppc de EnAd o NG-185. Para la qPCR, el ADN se recogió a 48 ó 72 horas después de la infección a partir de lisados celulares y sobrenadantes según los métodos detallados en el ejemplo 18. Las muestras de ADN extraídas se analizaron mediante qPCR usando un conjunto de cebador-sonda específico del gen EnAd E3 de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Los genomas virales totales detectados para NG-185 (Figura 53B) fueron similares al virus de referencia EnAd durante el transcurso del tiempo de infección.

- 55 Ejemplo 33: Producción de virus EnAd a partir del plásmido pColoAd2.6 (pNG-185)

El plásmido pEnAd2.6 (SEQ ID NO: 65) se usó para generar los plásmidos pNG-257 y pNG-281 mediante la

inserción directa de casetes transgénicos en los sitios de restricción únicos pEnAd2.6 ubicados en las regiones B_x y B_y. pNG-257 contiene un casete transgénico que codifica un ScFv anti-VEGF (SEQ ID NO: 36) con un marcador peptídico His C-terminal (SEQ ID NO: 23), flanqueado por un 5' bSA (SEQ ID NO: 18) y la secuencia 3' poli (A) (SEQ ID NO: 20) insertada en la región B_x. pNG-281 contiene casetes transgénicos que codifican un ScFv anti-VEGF (SEQ ID NO: 36) con un marcador peptídico de Histidina C-terminal (SEQ ID NO: 23), flanqueado por un 5' bSA (SEQ ID NO: 18) y una secuencia 3' poli(A) (SEQ ID NO: 20) insertada en la región B_x y un segundo casete transgénico que codifica un ScFv anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 37) con un marcador V5 (SEQ ID NO: 24) flanqueado por un 5' SSA (SEQ ID NO: 16) y la secuencia 3' poli (A) (SEQ ID NO: 20) insertada en la región B_y. Los esquemas de los casetes transgénicos insertados en los plásmidos pNG-257 y pNG-281 se muestran en la Figura 54. La construcción de plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN. Estos plásmidos contienen los genomas del virus EnAd NG-257 (SEQ ID NO: 72) y NG-281 (SEQ ID NO: 73).

Ejemplo 34: Producción de variantes de anticuerpo ScFv múltiples de expresión de virus EnAd

El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se usó para generar el plásmido pNG-272 por inserción directa de un casete que codifica un ScFv anti-VEGF y un ScFv anti-PD-L1 en los sitios de restricción únicos ubicados entre los genes L5 y E4 (región B_y). El casete transgénico pNG-272 codifica un ScFv anti-PD-L1 y ScFv anti-VEGF mediante la inclusión de una secuencia ScFv anti-PD-L1 (SEQ ID NO: 37), una secuencia peptídica P2A de alta eficacia de autoescisión (SEQ ID NO: 25), una secuencia de ScFv anti-VEGF (SEQ ID NO: 36) y una secuencia de poliadenilación en 3' (SEQ ID NO: 20). Los esquemas de los casetes transgénicos insertados se muestran en la Figura 54. La construcción de los plásmidos se confirmó por secuenciación de ADN.

Producción de virus

El virus NG-272 (SEQ ID NO: 69) se amplifica y se purifica de acuerdo con los métodos usados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8.

Ejemplo 35: Producción de virus EnAd que codifican la proteína transmembrana, simportador de sodio/yoduro (NIS)

El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se usa para generar el plásmido pNG-280 por inserción directa de un casete transgénico que codifica el simportador de yoduro de sodio (NIS) en la región B_y. El casete pNG-280 contiene una secuencia 5' SSA (SEQ ID NO: 16), NIS cDNA (SEQ ID NO: 67) y una secuencia 3' poly(A) (SEQ ID NO: 20) y codifica el genoma del virus NG-280 (SEQ ID NO: 68). Los esquemas de los casetes de transgenes insertados se muestran en la Figura 54. La construcción de los plásmidos se confirma por secuenciación.

Ejemplo 36: Producción de virus EnAd que expresan shRNA

El plásmido pEnAd2.4 (SEQ ID NO: 64) se usa para generar los plásmidos pNG-sh01 y pNG-sh02 mediante la inserción directa de casetes que codifican respectivamente un shRNA a la proteína GAPDH, o un shRNA de control que no comparte una secuencia con cualquier gen humano. El casete pNG-sh01 contiene un promotor de ARN polimerasa III humana U6, y una secuencia de shRNA que consiste en: una secuencia de 29 nt antisentido, una secuencia de bucle, una secuencia sentido de 29 nt y una secuencia 3' TTTT. Los esquemas de los casetes de transgenes insertados se muestran en la Figura 54. La construcción de plásmidos se confirma por secuenciación de ADN.

Producción y caracterización de virus

Los virus NG-sh01 (SEQ ID NO: 66) y NG-sh02 se amplifican y purifican según los métodos utilizados para purificar el virus NG-135 detallado en el Ejemplo 8. La expresión de GAPDH en líneas celulares humanas disminuye en las células tratadas con NG-sh01 pero no en las células tratadas con NG-sh02.

REIVINDICACIONES

1. Un adenovirus oncolítico del grupo B competente en replicación que comprende una secuencia de fórmula (I):



en donde:

5 B₁ comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

B_A comprende: E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ es un enlace o comprende: E3;

B_X es un enlace o una secuencia de ADN que comprende: un sitio de restricción, uno o más transgenes o ambos; B_B comprende L5;

10 B_Y comprende un casete transgénico que comprende un transgén y una secuencia aceptora de empalme; y B₃ es un enlace o comprende: E₄,

en el que el casete transgénico está bajo el control de un promotor endógeno seleccionado del grupo que consiste en E4 y el promotor tardío principal, y en el que el casete transgénico comprende un gen terapéutico que codifica un material seleccionado del grupo que consiste en una secuencia RNAi, una proteína, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, una quimioquina, una citocina, un inmunomodulador y una enzima.

15

2. Un adenovirus competente en la replicación según la reivindicación 1, en el que el promotor es el promotor principal tardío.

3. Un adenovirus competente en la replicación de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que B_Y también comprende la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 11 o una secuencia de ADN que se hibrida en condiciones rigurosas.

20

4. Un adenovirus competente en la replicación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aceptor de corte y empalme se selecciona de CAGG, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18.

5. Un adenovirus competente en la replicación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el casete transgénico comprende además una secuencia interna de entrada al ribosoma o un péptido 2A de alta eficacia de autoescisión.

25

6. Un adenovirus competente en la replicación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el transgén comprende adicionalmente una secuencia de Kozak.

7. Un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el casete transgénico comprende además una secuencia de poliadenilación.

30 8. Un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el casete transgénico comprende además un sitio de restricción en el extremo 3' de la secuencia de ADN y/o en el extremo 5' de la secuencia de ADN.

9. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que al menos un casete transgénico codifica ARNm monocistrónico, o un ARNm policistrónico.

35 10. Un adenovirus según la reivindicación 1 a 9, en el que el anticuerpo o fragmento de unión del mismo es específico para OX40, ligando OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, ligando CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS, ligando ICOS, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT, CD160, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2.

40 11. Un adenovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la proteína codificada es una citoquina seleccionada independientemente del grupo que comprende IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TGF β , linfotoxina α (LTA) y GM-CSF.

45 12. Un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína codificada es una quimioquina seleccionada independientemente del grupo que comprende IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 y CRTH2.

13. Un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el transgén es un gen indicador, por ejemplo, un simportador de yoduro de sodio, metaloproteínas intracelulares, HSV1-tk, GFP, luciferasa o receptor de estrógeno.

14. Un adenovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el adenovirus es Ad11.
15. Un adenovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el adenovirus es el virus conocido como EnAd mostrado en la secuencia ID N°: 12.
- 5 16. Un adenovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el virus comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO : 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o SEQ ID NO: 73.
17. Una composición que comprende un adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 10 18. Un adenovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición de la reivindicación 17, para su uso en tratamientos.

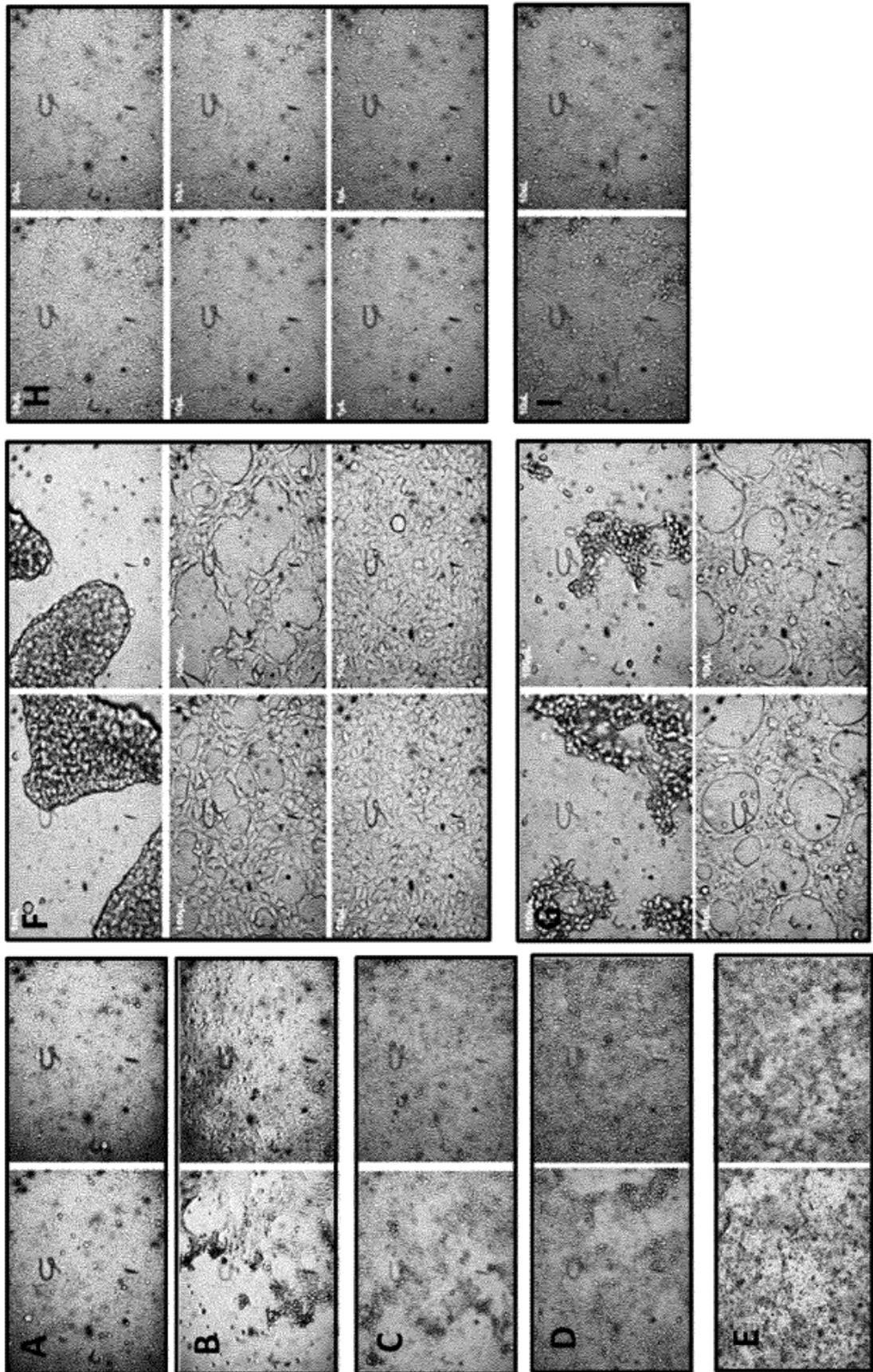


Figura 1

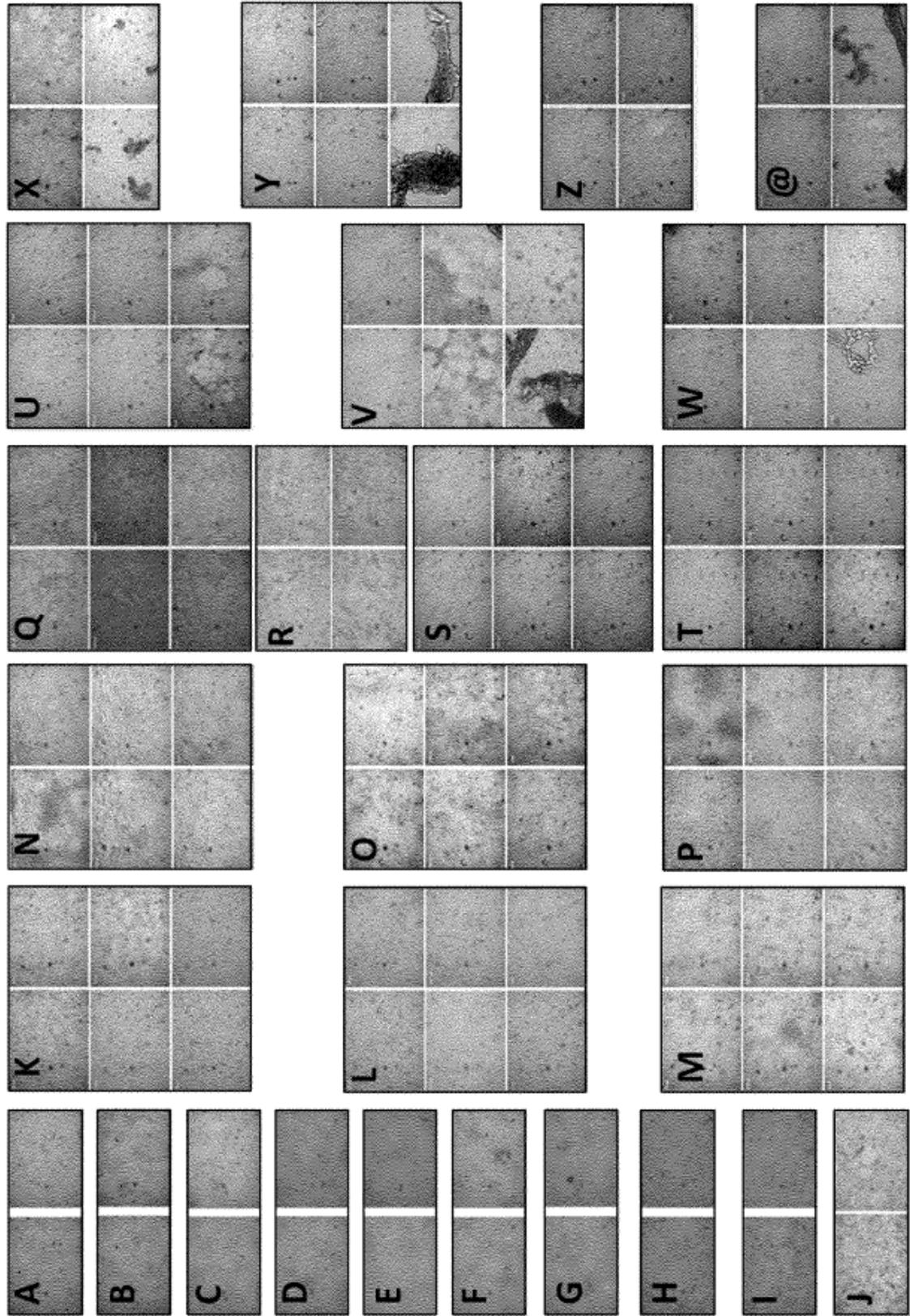


Figura 2

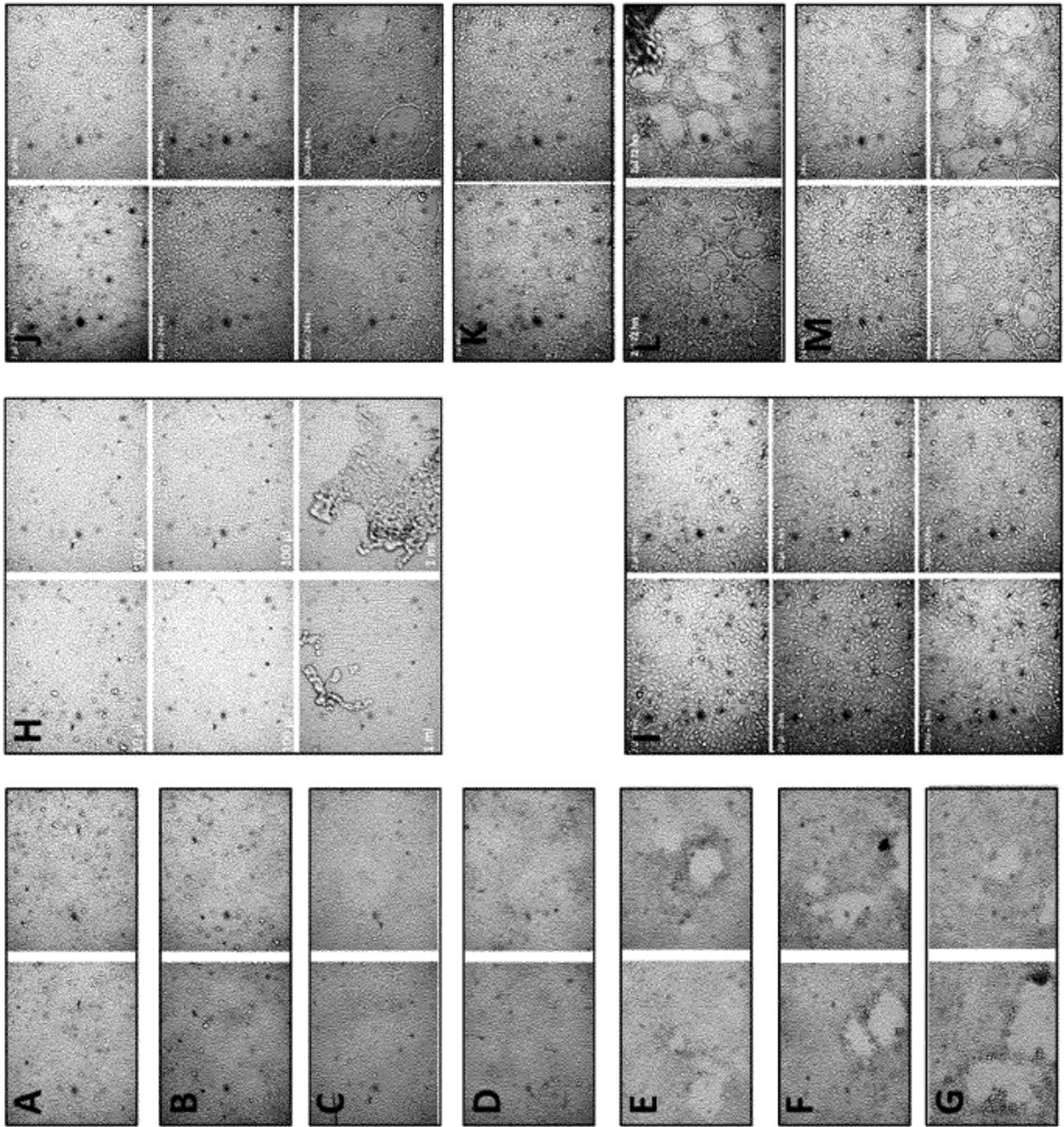


Figura 3

Figura 4A

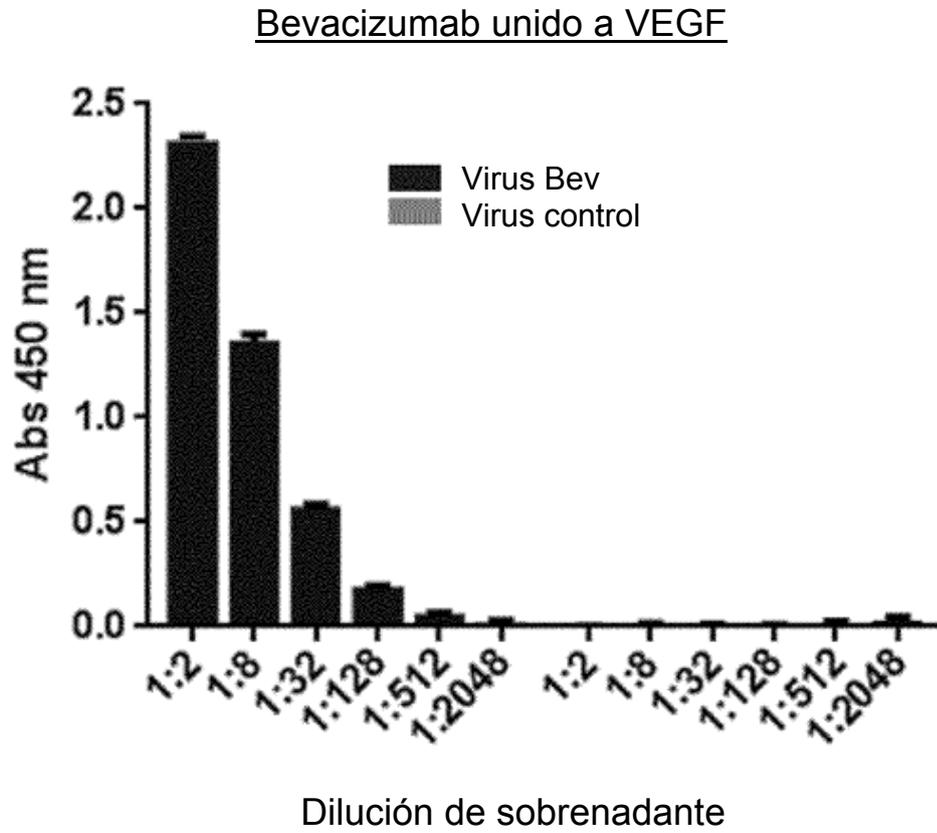


Figura 4B

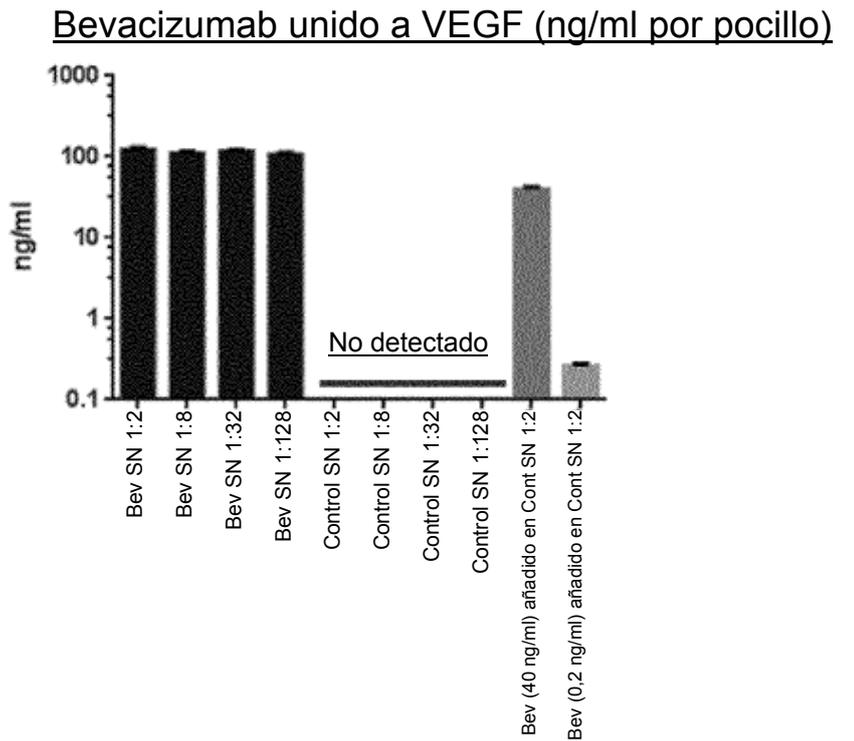


Figura 5

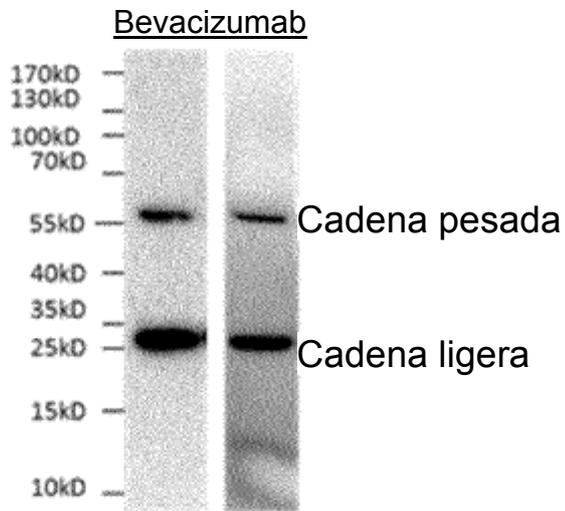


Figura 6

Curva estándar del producto clínico

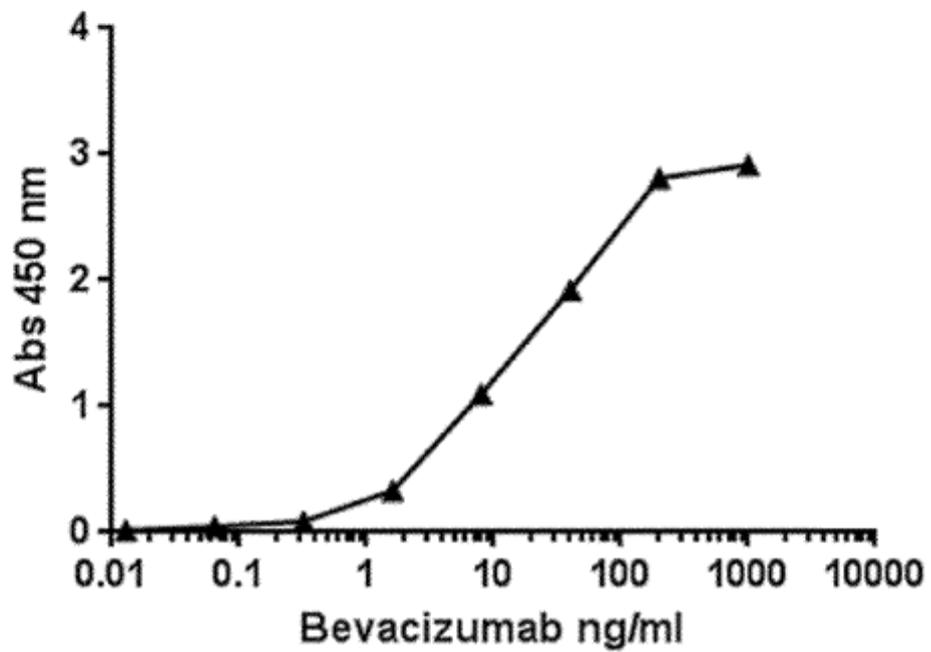


Figura 7

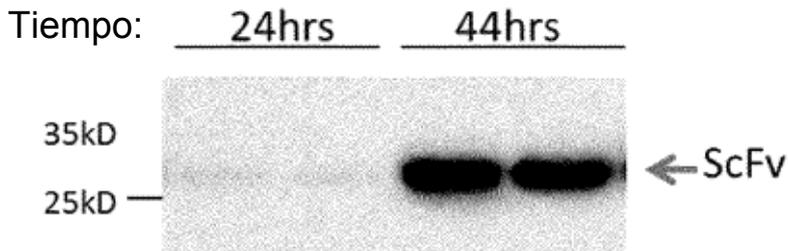


Figura 8

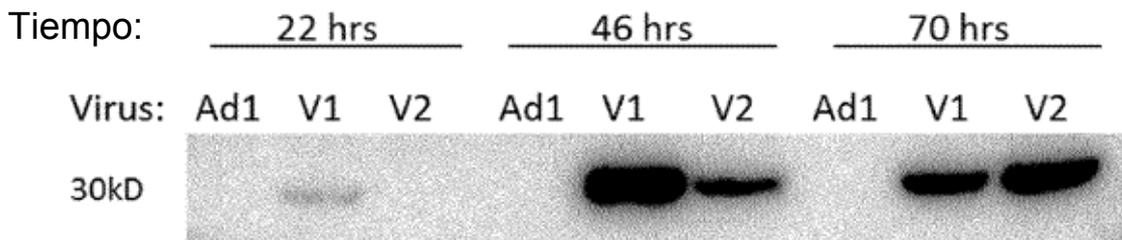


Figura 9

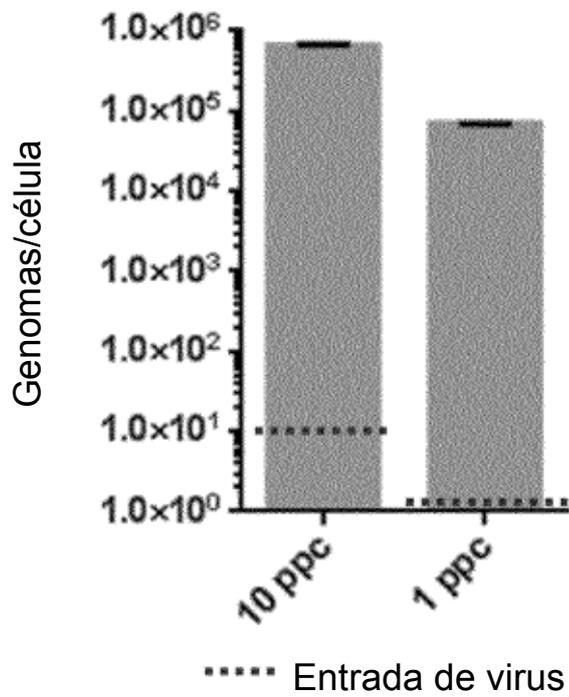
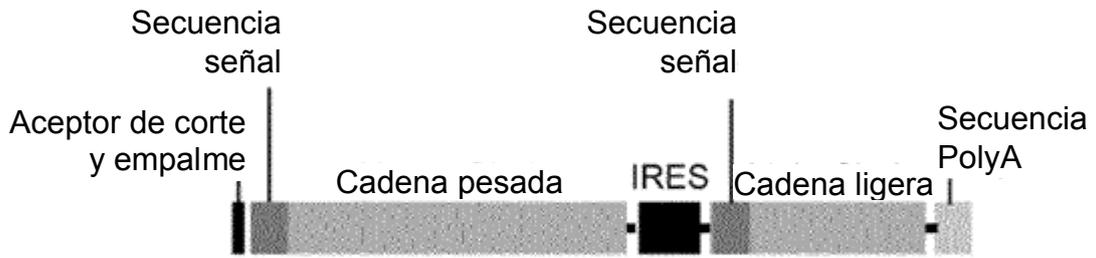
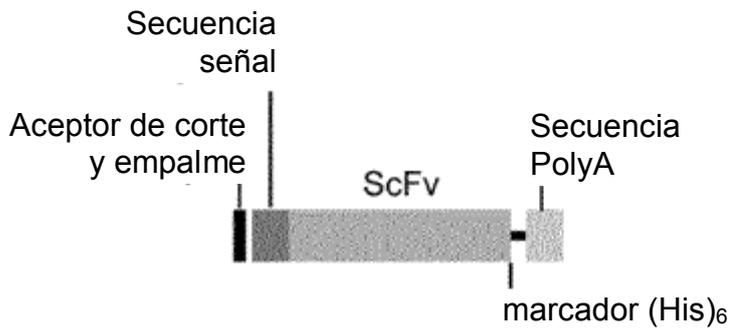


Figura 10

A NG-135



B NG-78



C NG-76

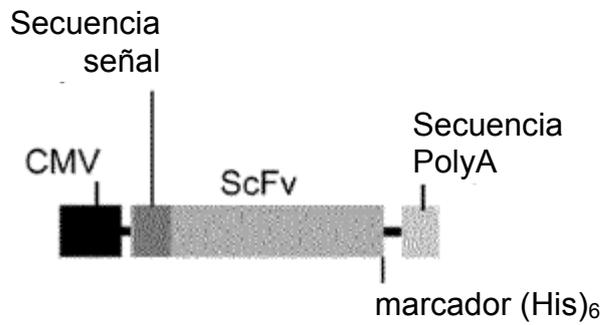


Figura 11

ColoAd1 = EnAd

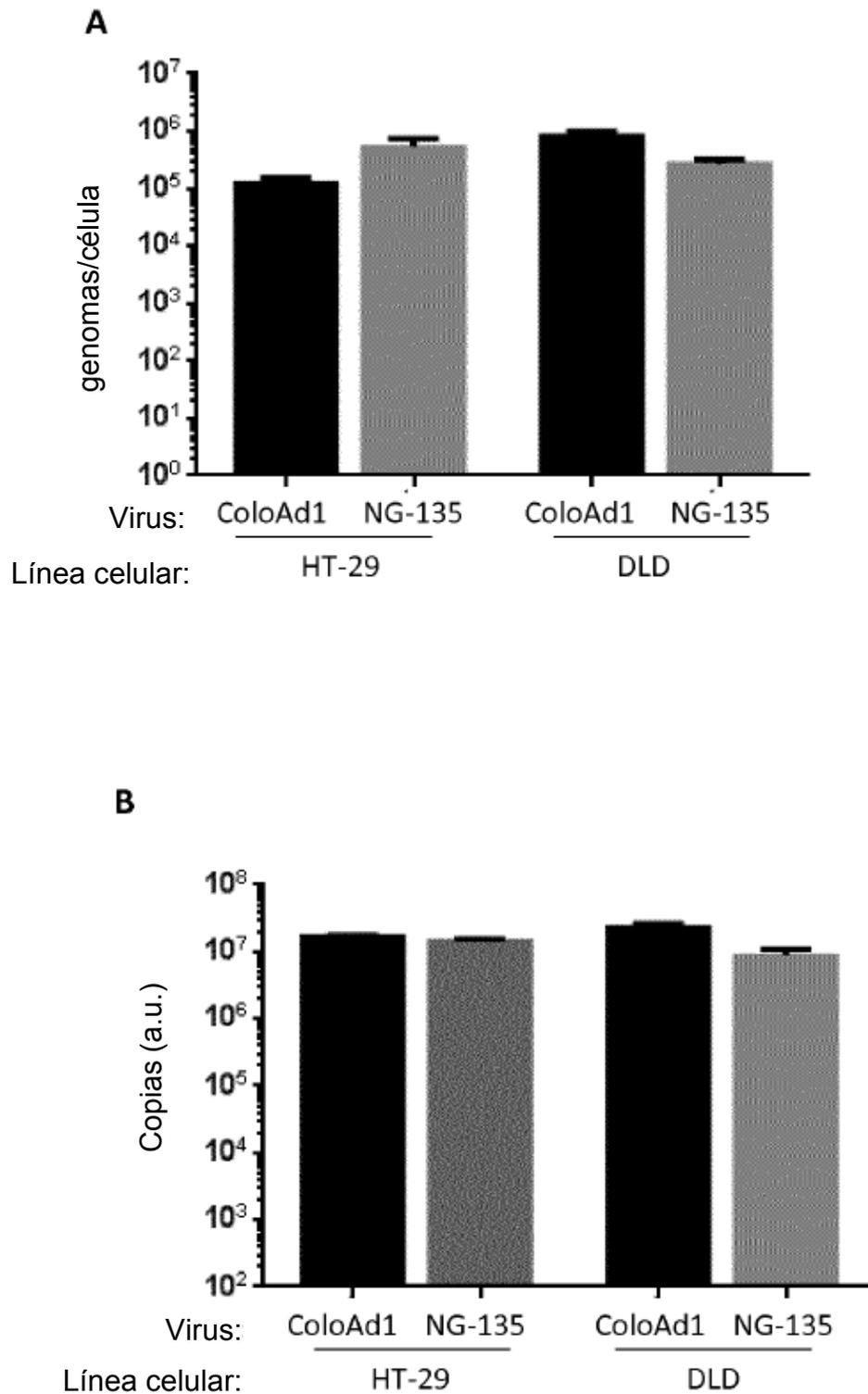


Figura 12 ColoAd1 = EnAd

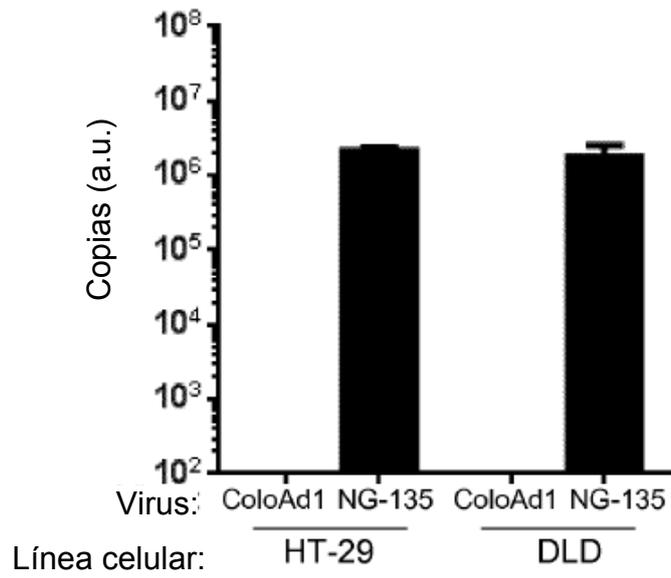


Figura 13

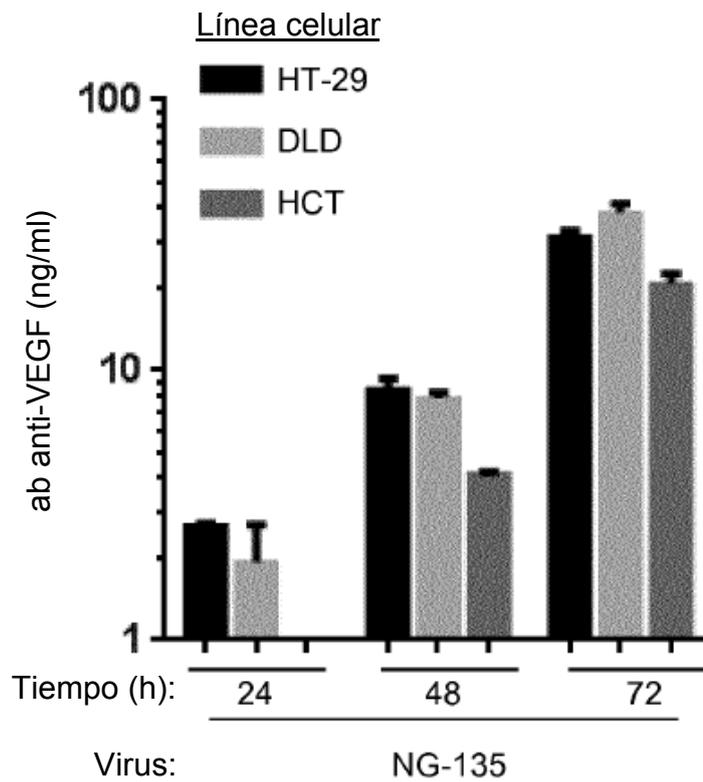
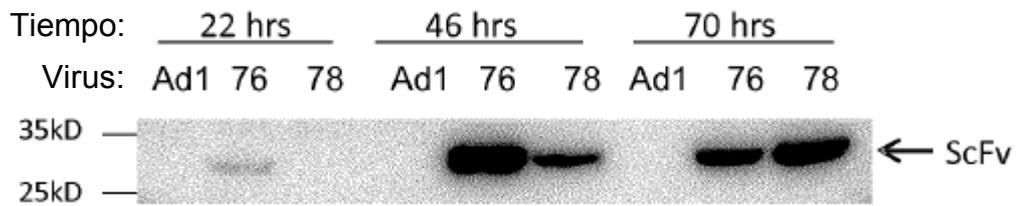


Figura 14

ColoAd1 = EnAd

A



B

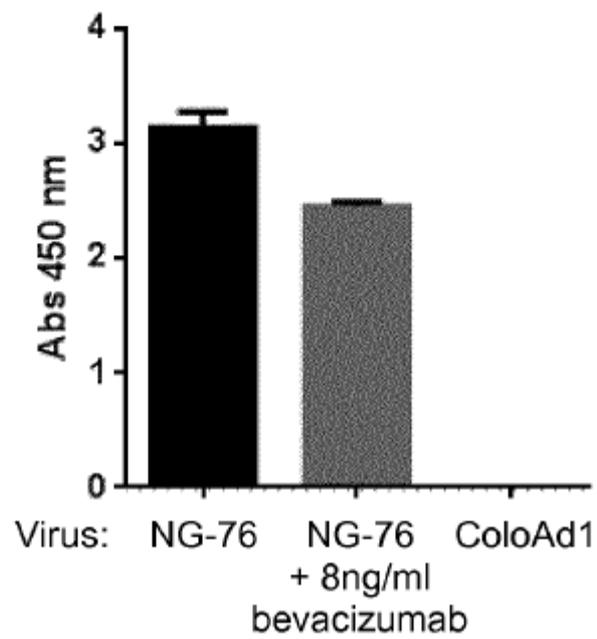
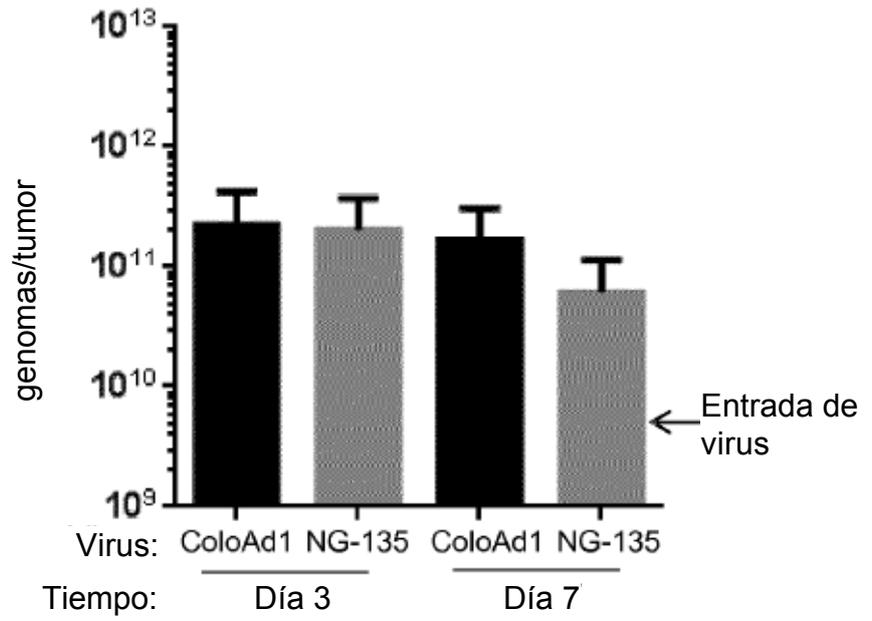


Figura 15

ColoAd1 = EnAd

A



B

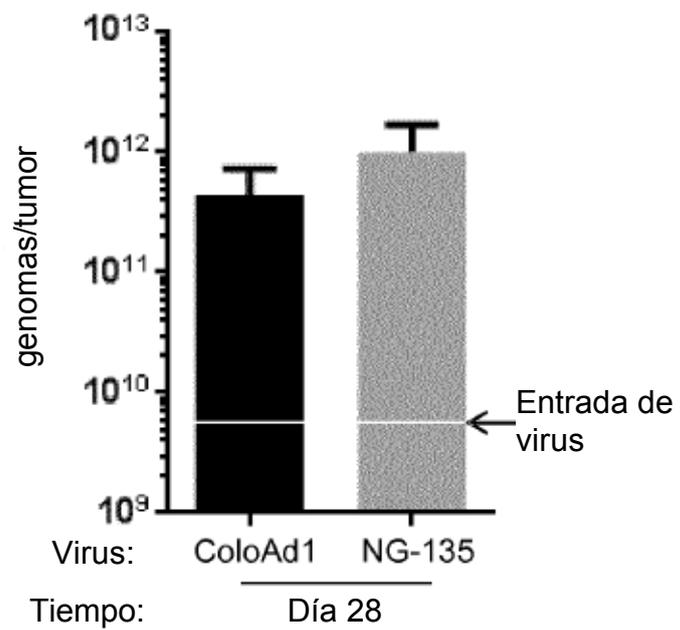
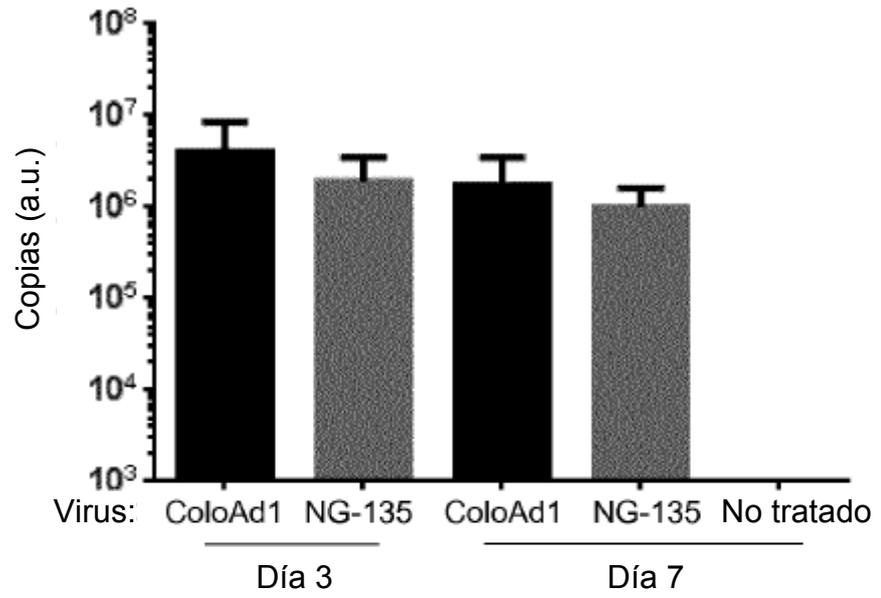


Figura 16 ColoAd1 = EnAd

A



B

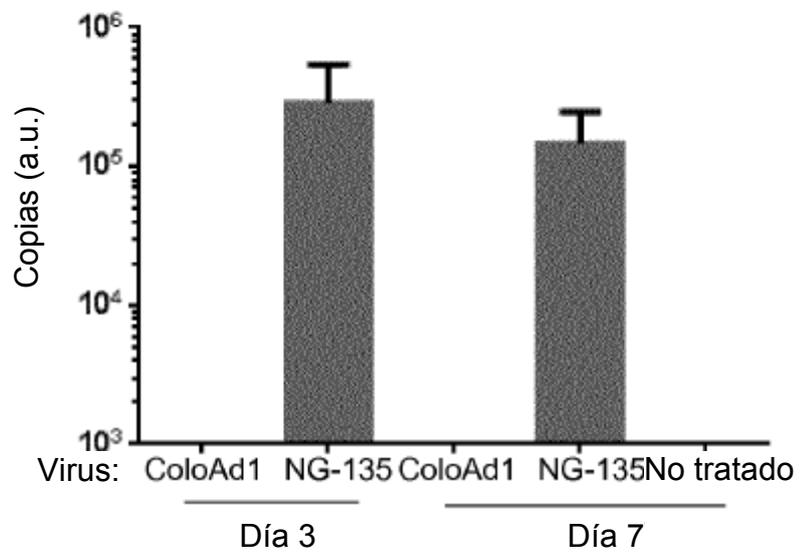


Figura 17 ColoAd1 = EnAd

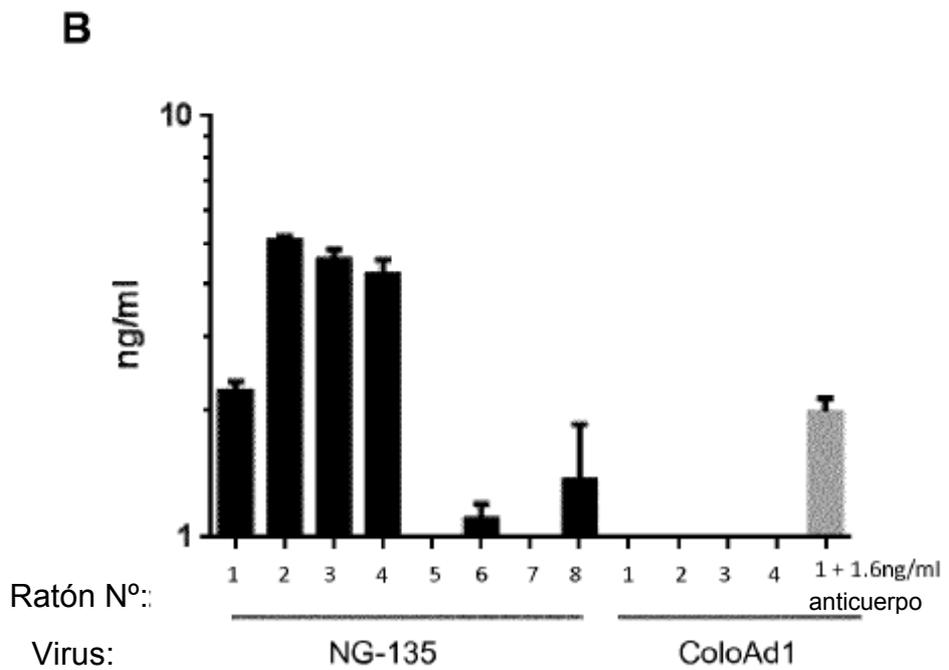
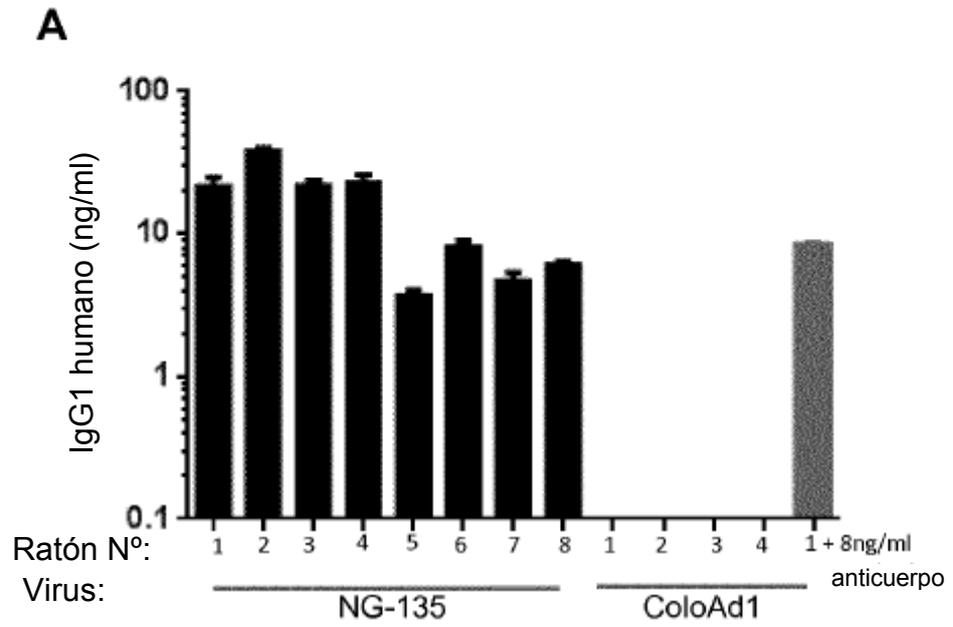
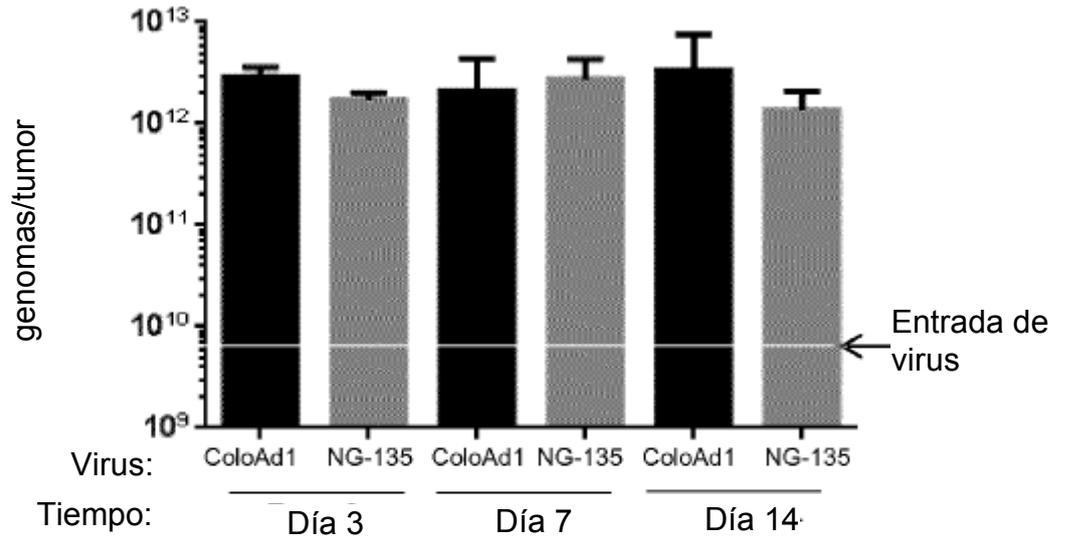


Figura 18 ColoAd1 = EnAd

A



B

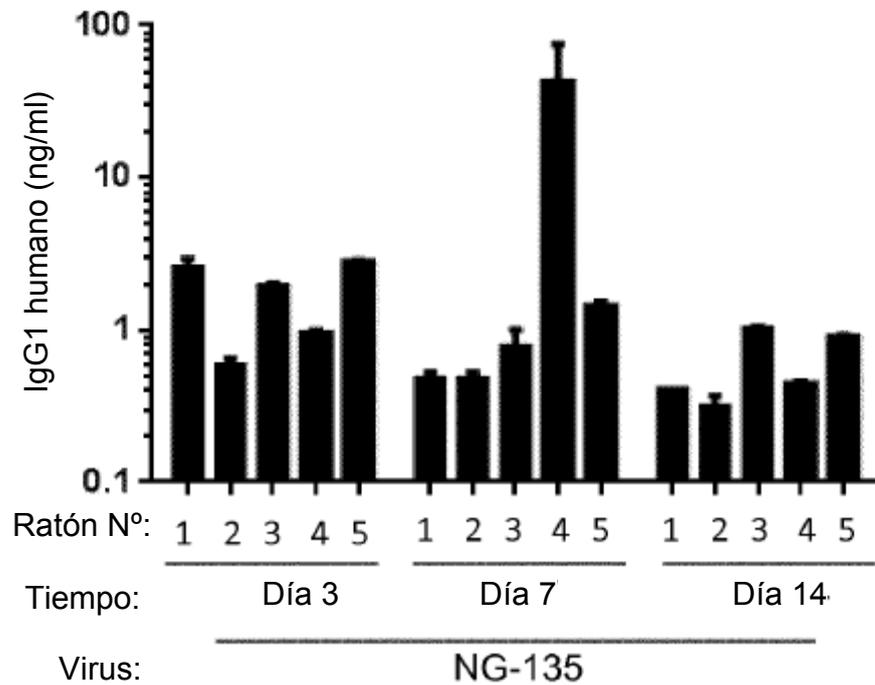


Figura 19 ColoAd1 = EnAd

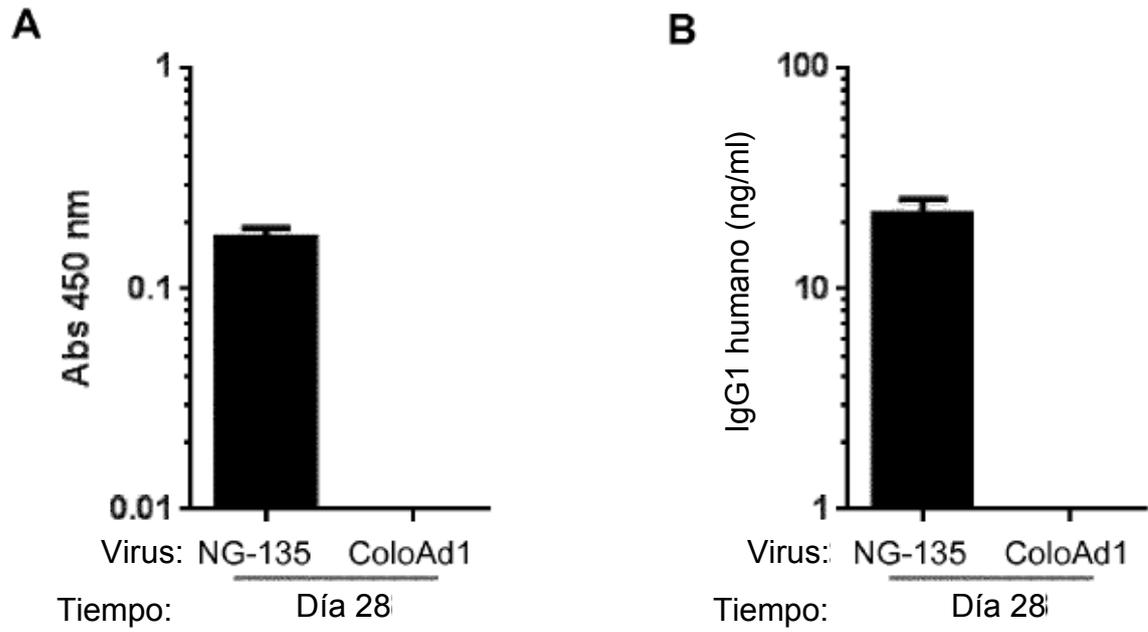


Figura 20

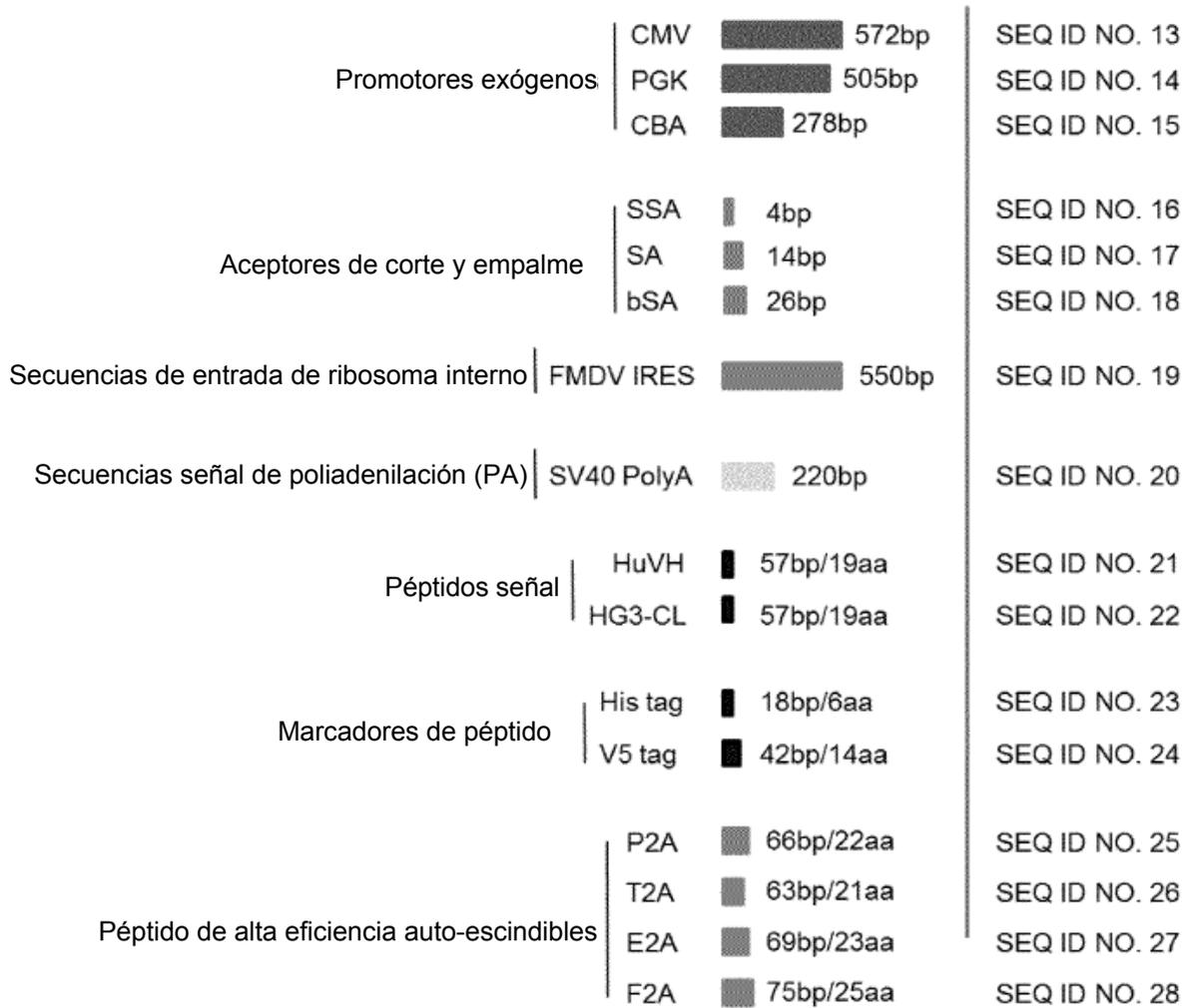


Figura 21

Cadenas pesadas variables de anticuerpo	Anti-VEGF	369bp/123aa	SEQ ID NO. 29
	Anti-PD-L1	354bp/118aa	SEQ ID NO. 30
Cadenas ligeras variables de anticuerpo	Anti-VEGF	324bp/108aa	SEQ ID NO. 31
	Anti-PD-L1	324bp/108aa	SEQ ID NO. 32
Cadenas pesadas constantes de anticuerpo	hlgG1	990bp/330aa	SEQ ID NO. 33
	hlgG1 modificado	990bp/330aa	SEQ ID NO. 34
Cadenas ligeras constantes de anticuerpo	hKappa LC	318bp/106aa	SEQ ID NO. 35
Dominios de anticuerpo: ScFv	Anti-VEGF	738bp/246aa	SEQ ID NO. 36
	Anti-PD-L1	723bp/241aa	SEQ ID NO. 37
Genes indicadores	GFP	717bp/239aa	SEQ ID NO. 38
	Luciferasa	1650bp/550aa	SEQ ID NO. 39
Citoquinas	TNF α	624bp/208aa	SEQ ID NO. 40
	IFN γ	498bp/166aa	SEQ ID NO. 41
	IFN α	564bp/188aa	SEQ ID NO. 42
Antígenos asociados a tumor	NY-ESO-1	324bp/108aa	SEQ ID NO. 43
	MUC-1	1255aa	SEQ ID NO. 44

Figura 22

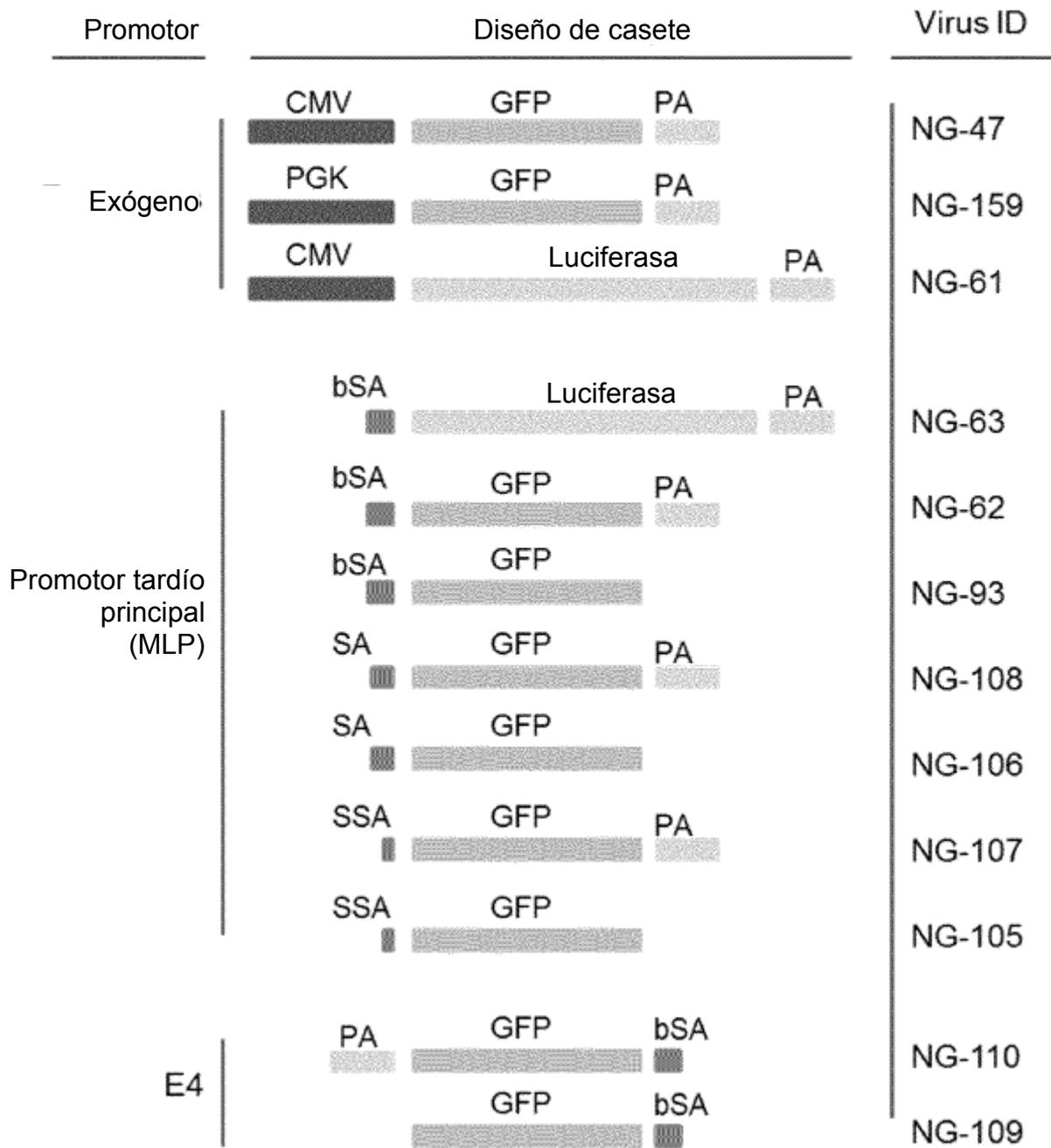


Figura 23

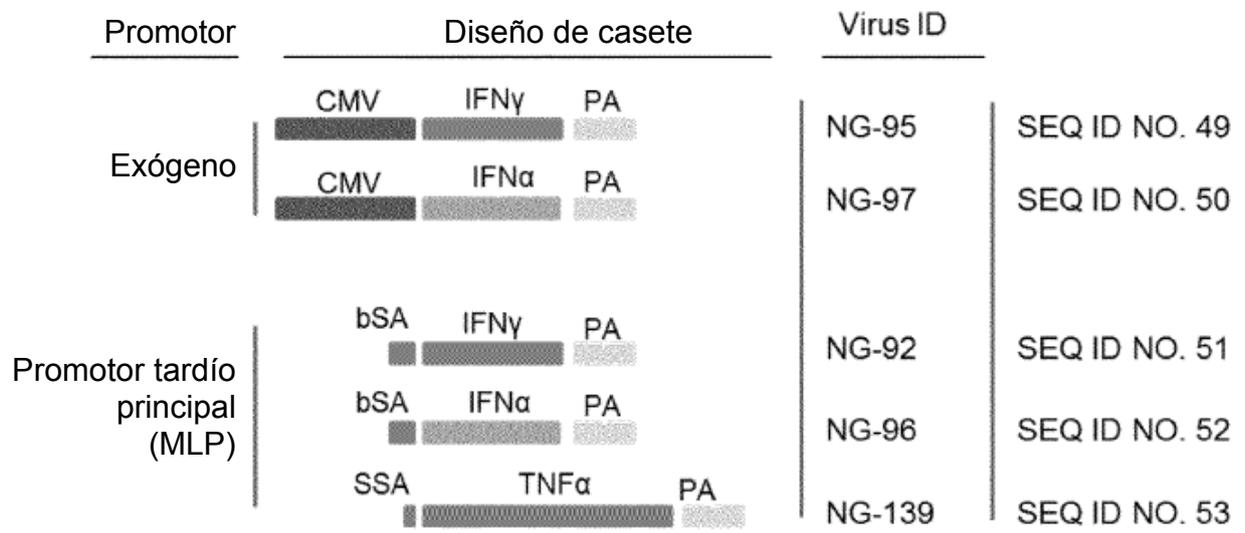


Figura 24

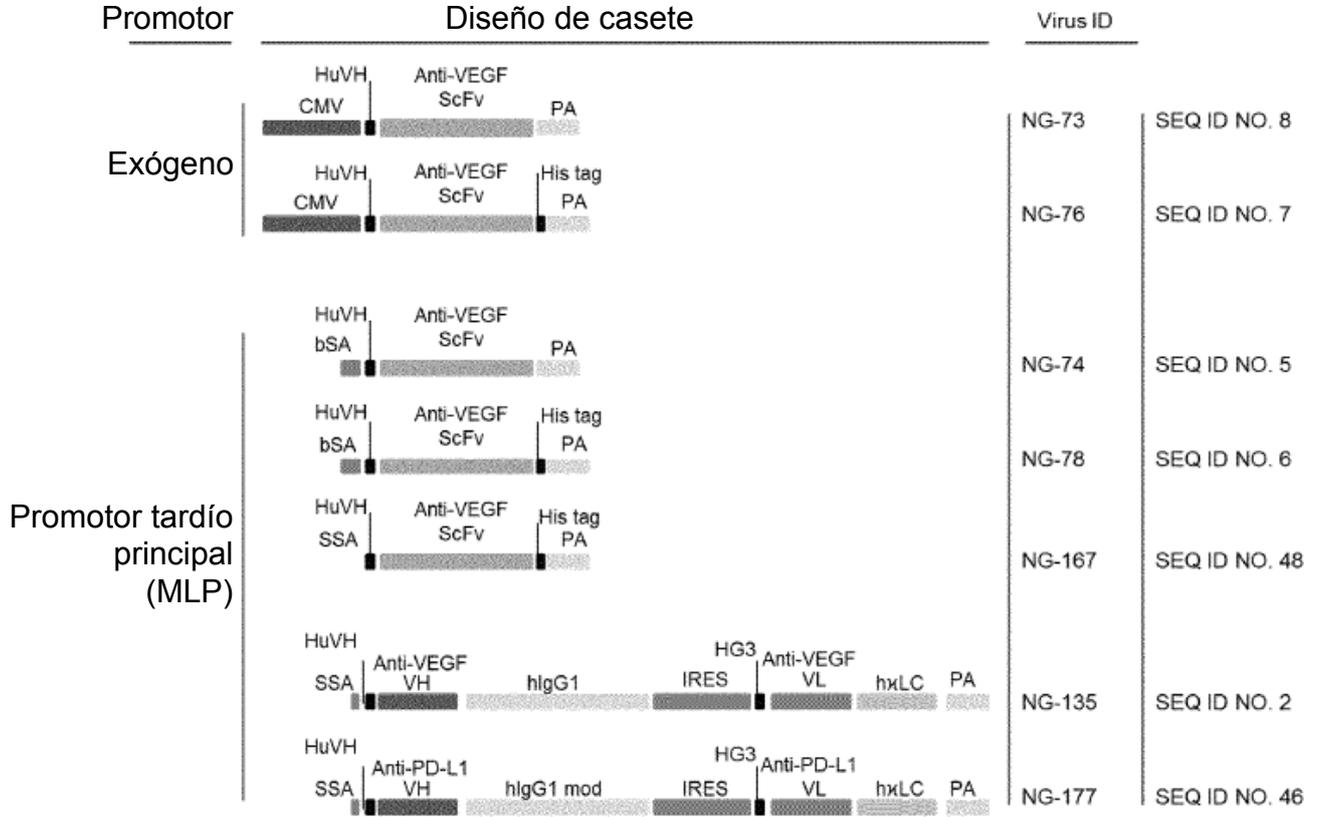


Figura 25

ColoAd1 = EnAd

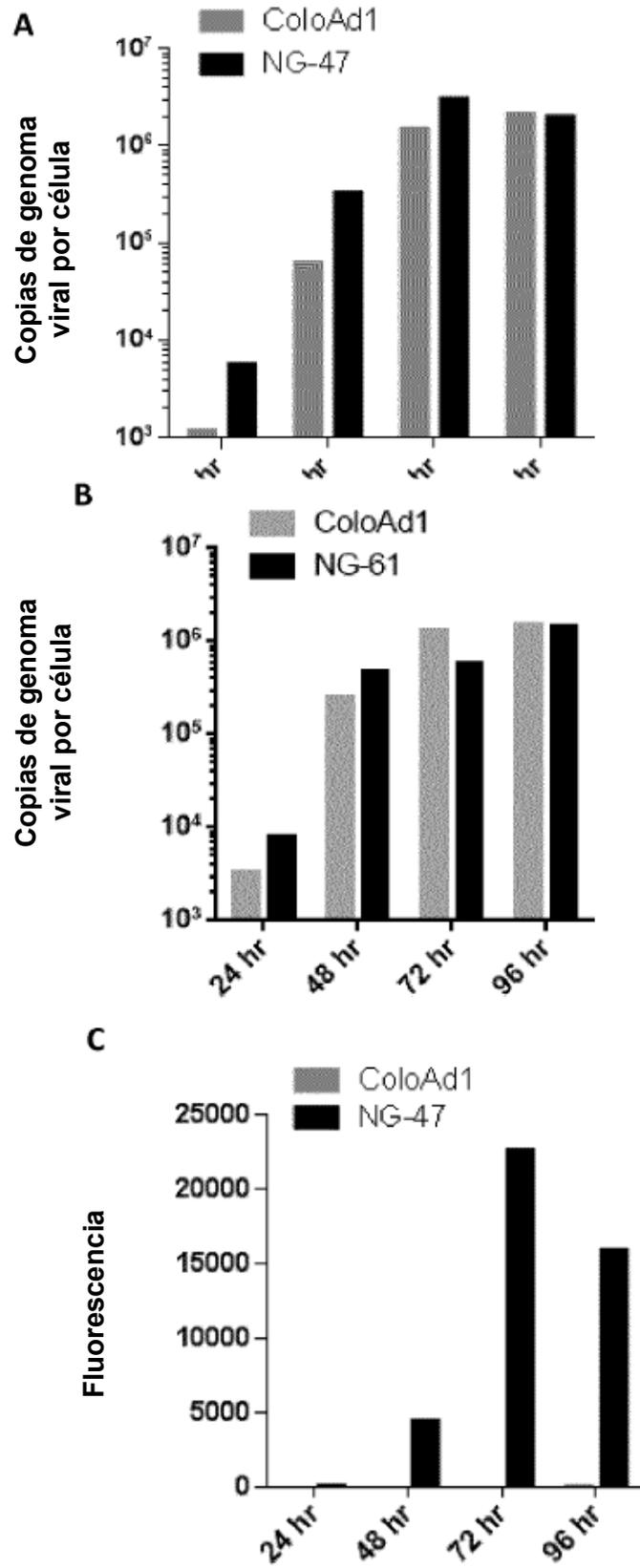


Figura 26

ColoAD1 = EnAd

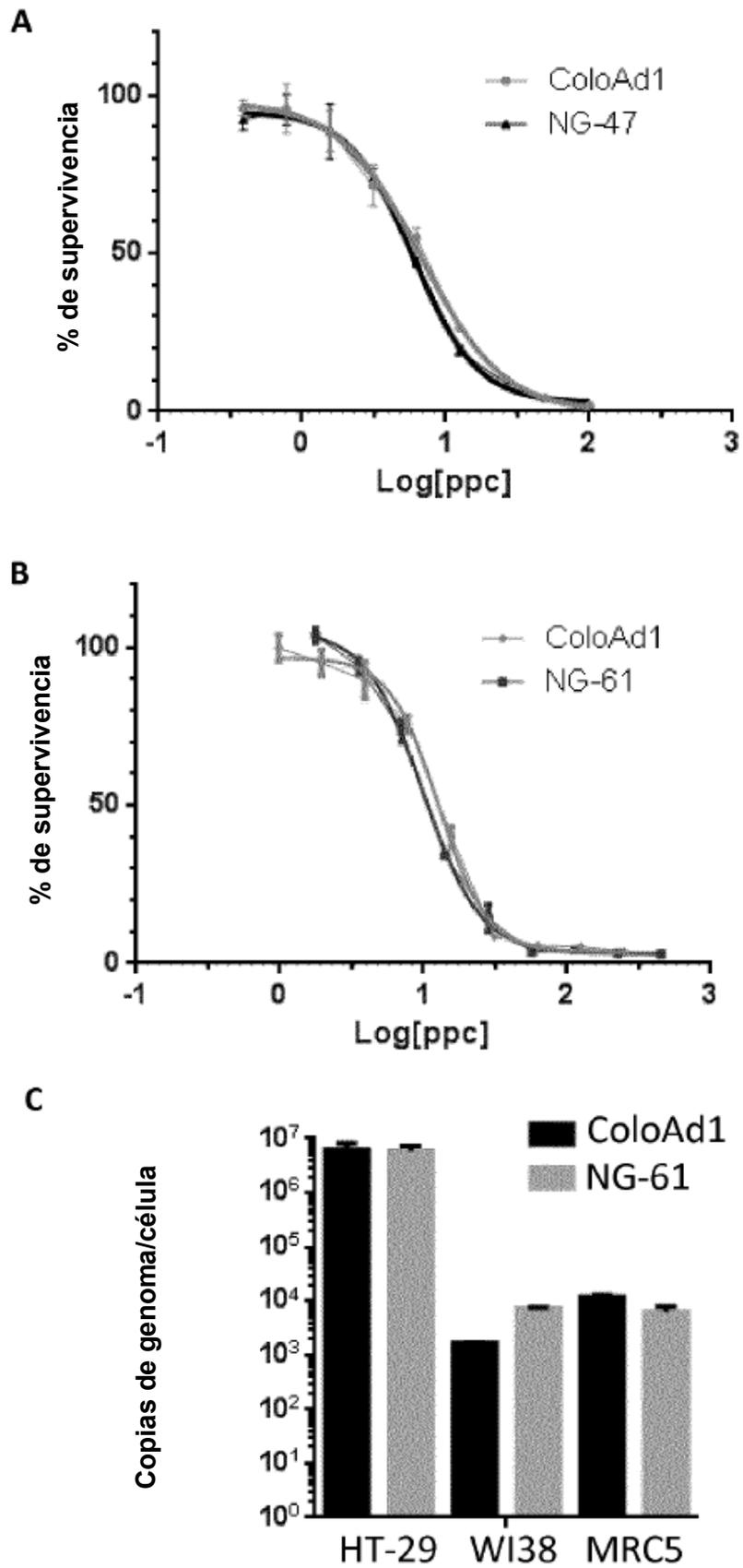
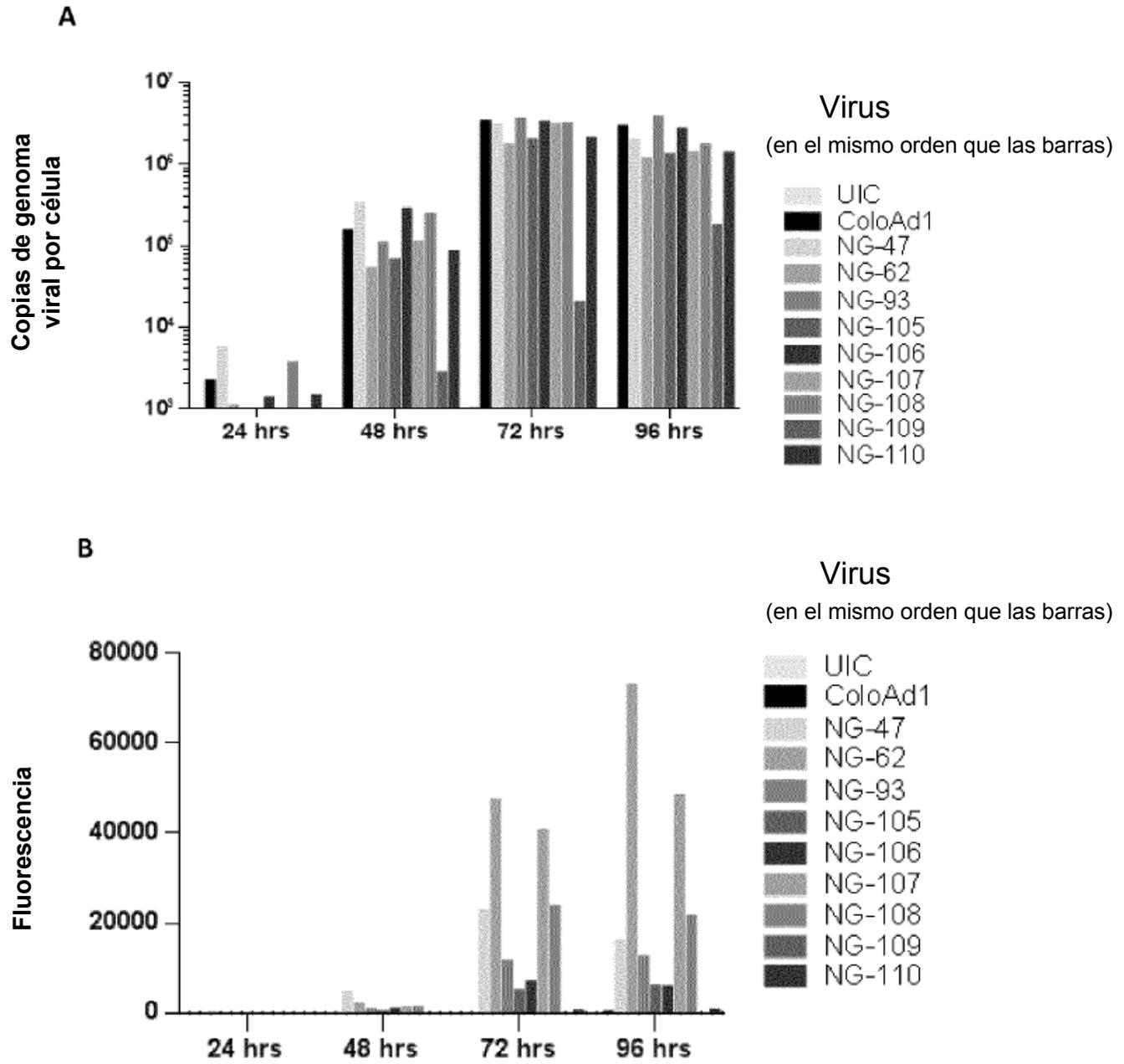
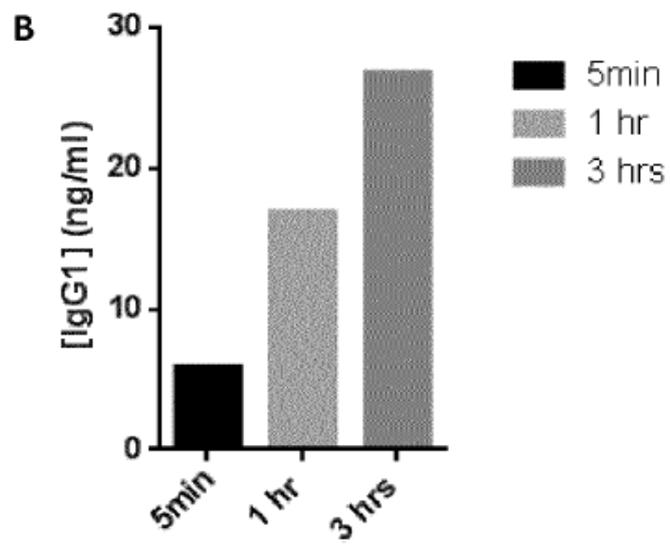
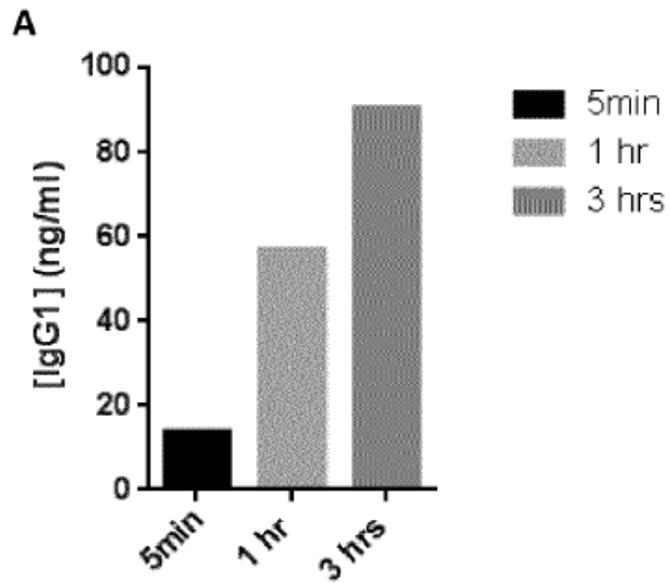


Figura 27



ColoAd1 = EnAd; UIC = control no infectado

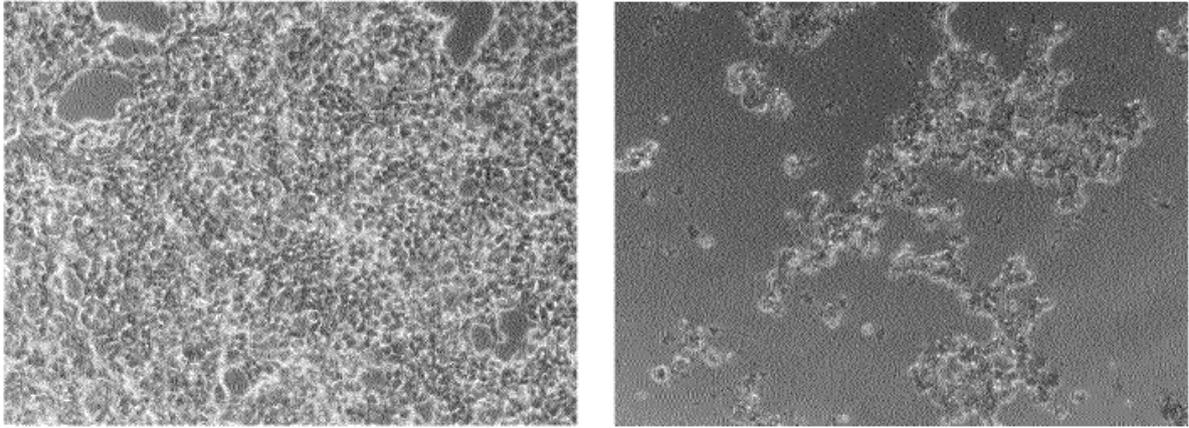
Figura 28



C

	Producción de Ab total (ng/ml)/1e6 células	
	Células HT-29	Células A549
24hrs	62.4	53.6
48hrs	724	287.2
72hrs	915.2	222.4

Figura 29 ColoAd1 = EnAd



A

B

C

	Producción de TNF (ng/ml)
	Células HT-29
24hrs	0.233
36hrs	15.7

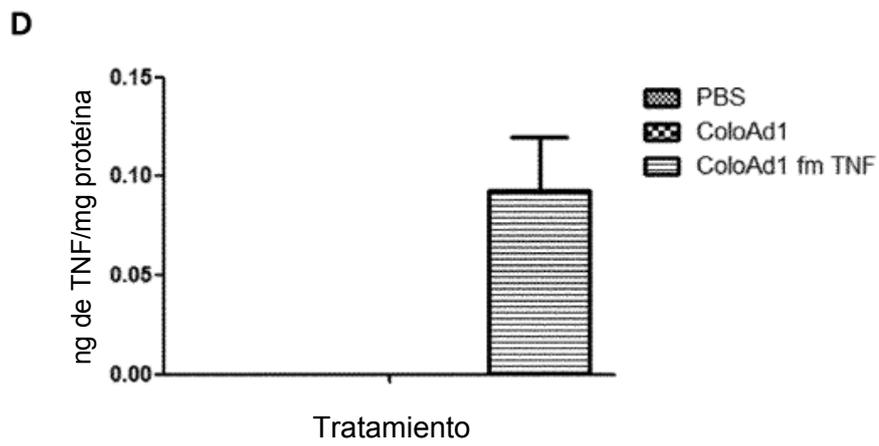


Figura 30

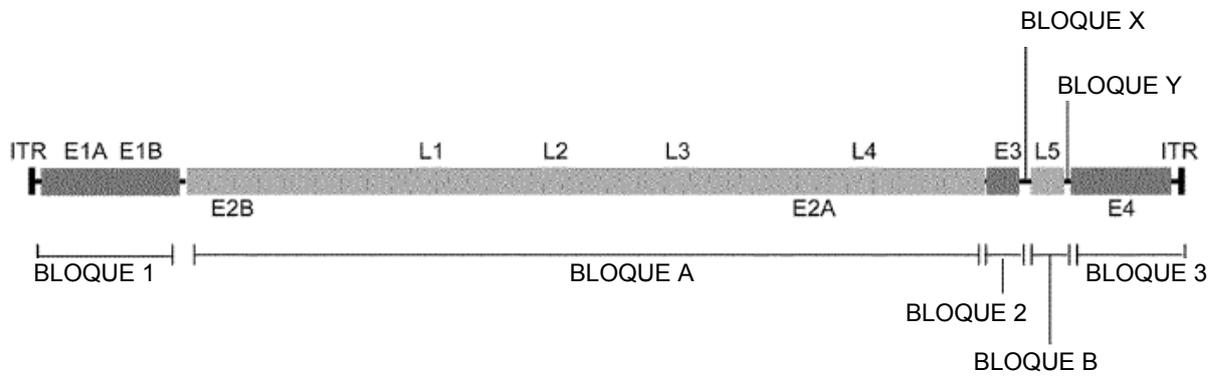


Figura 31

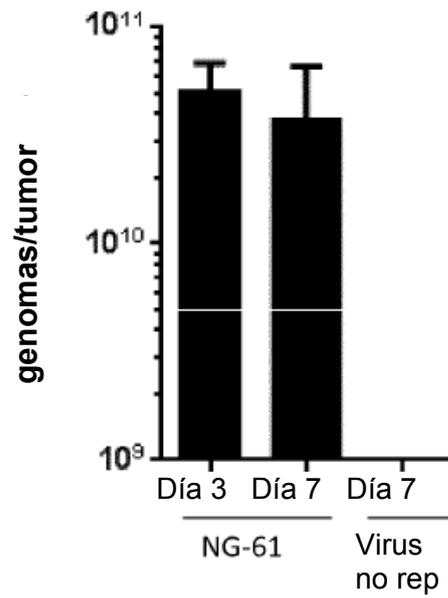


Figura 32

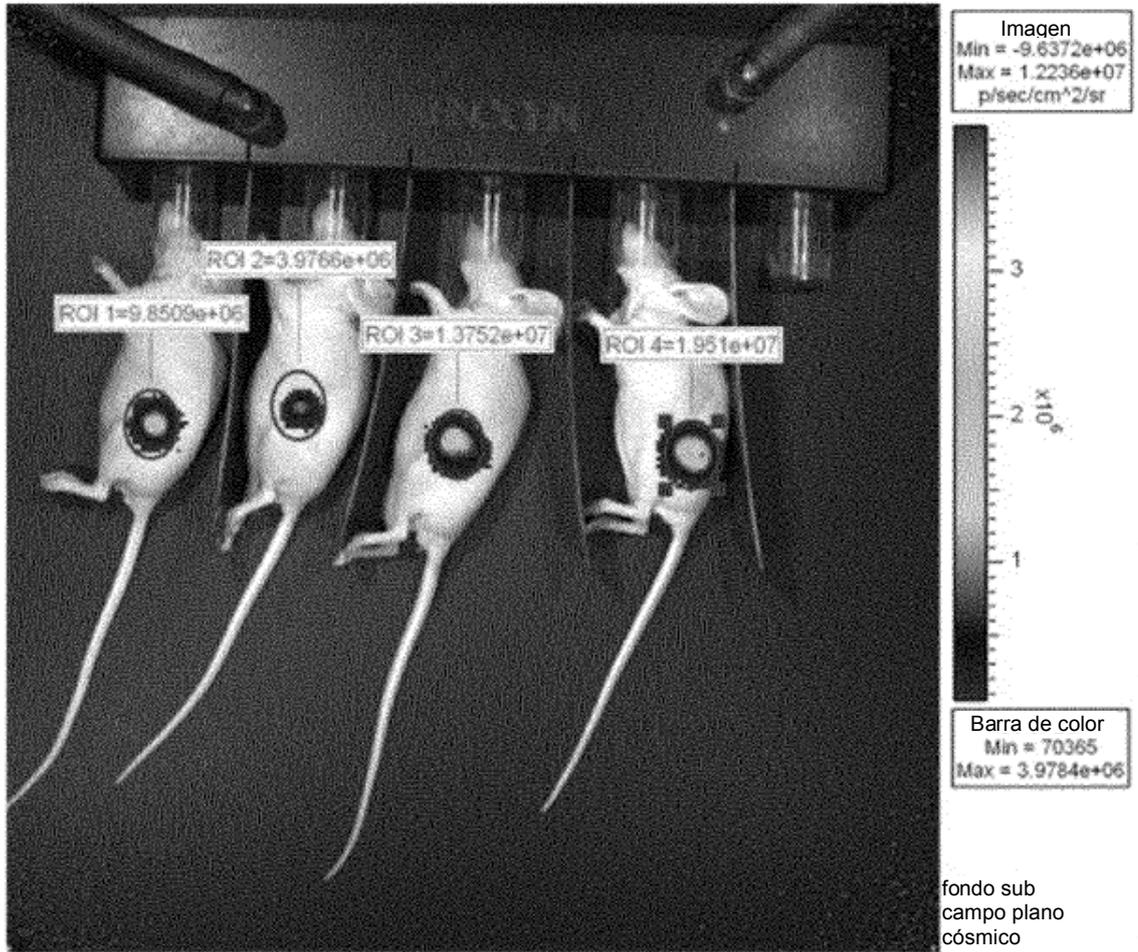


Figura 33

Ad1 = EnAD; 135 = NG-135

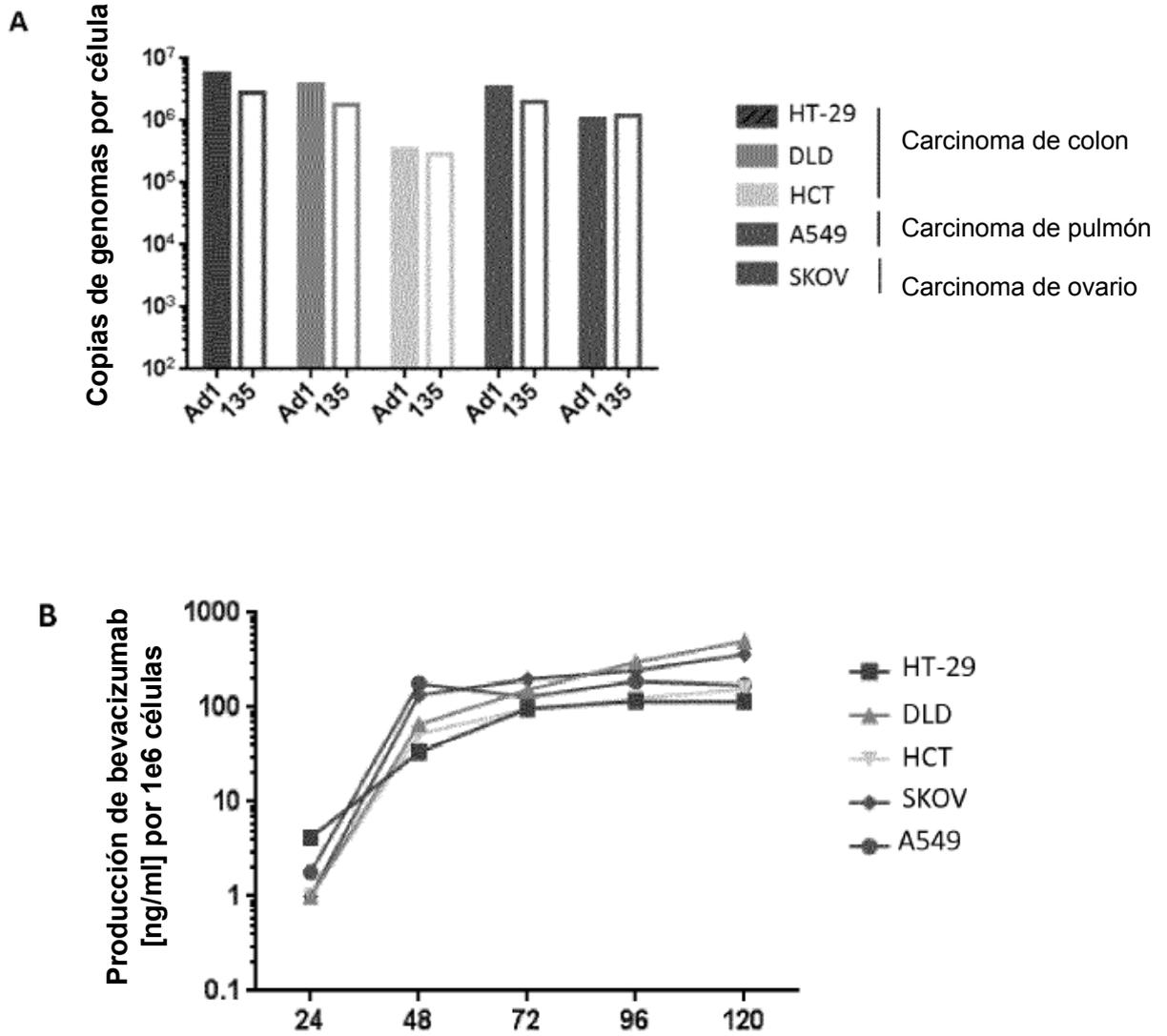


Figura 34

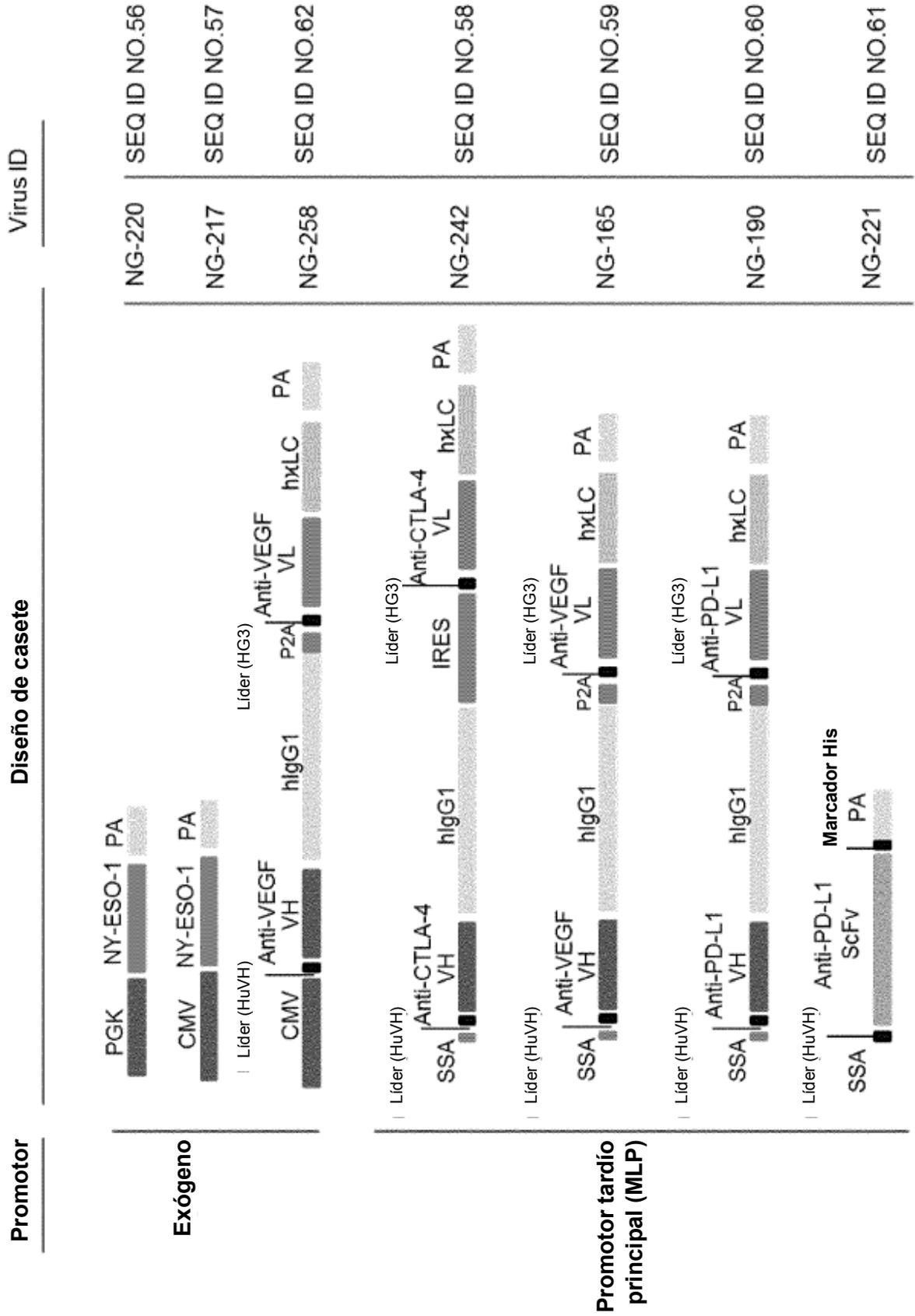


Figura 35

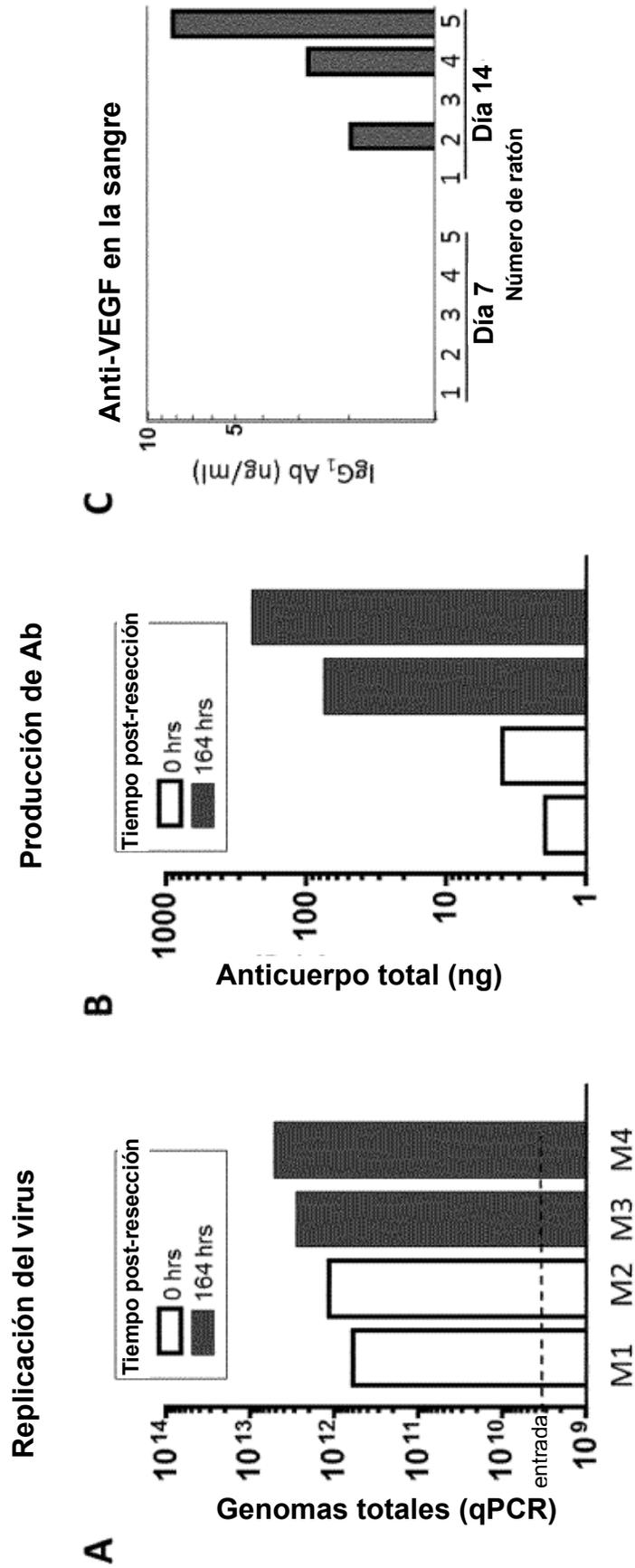
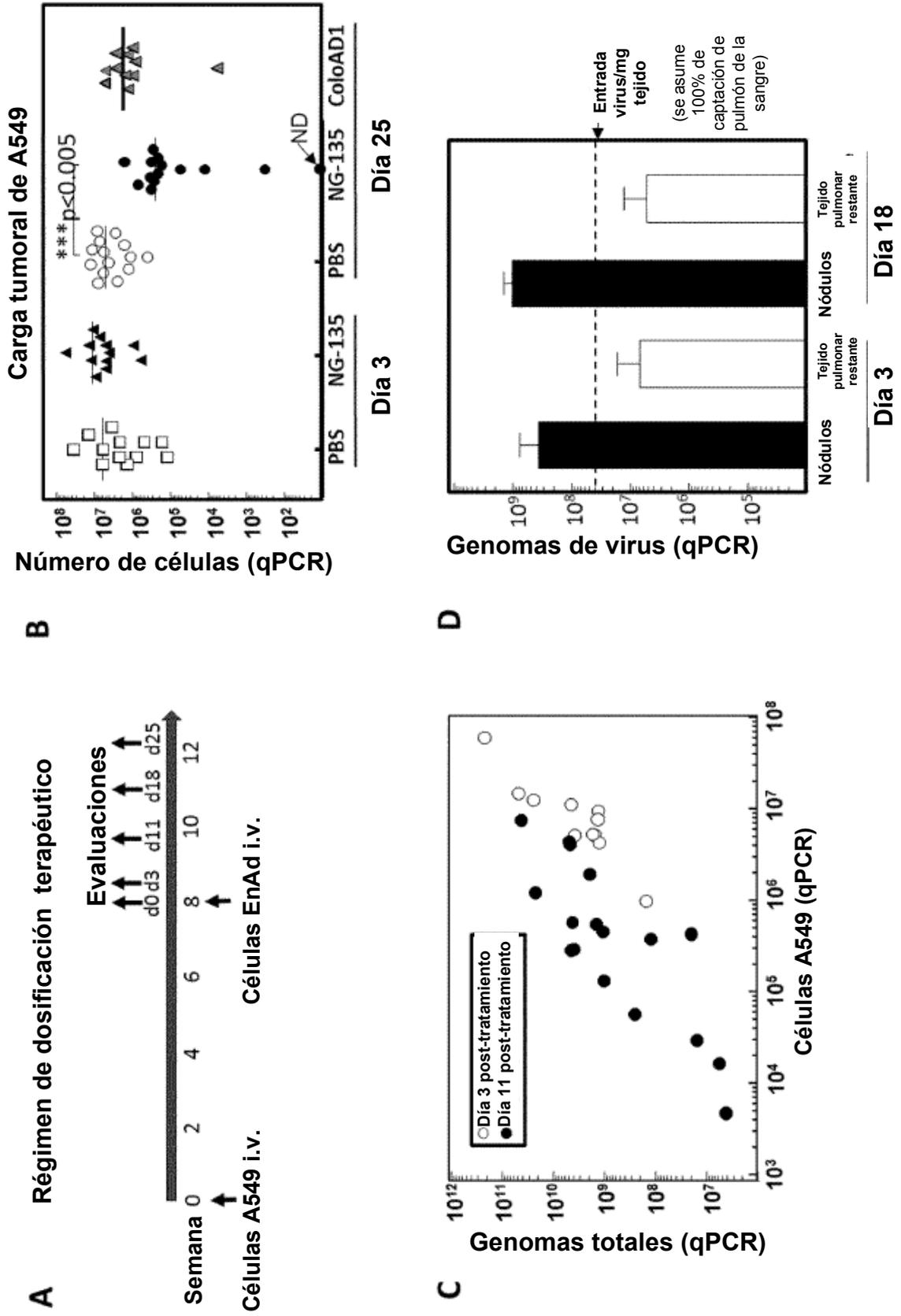


Figura 36



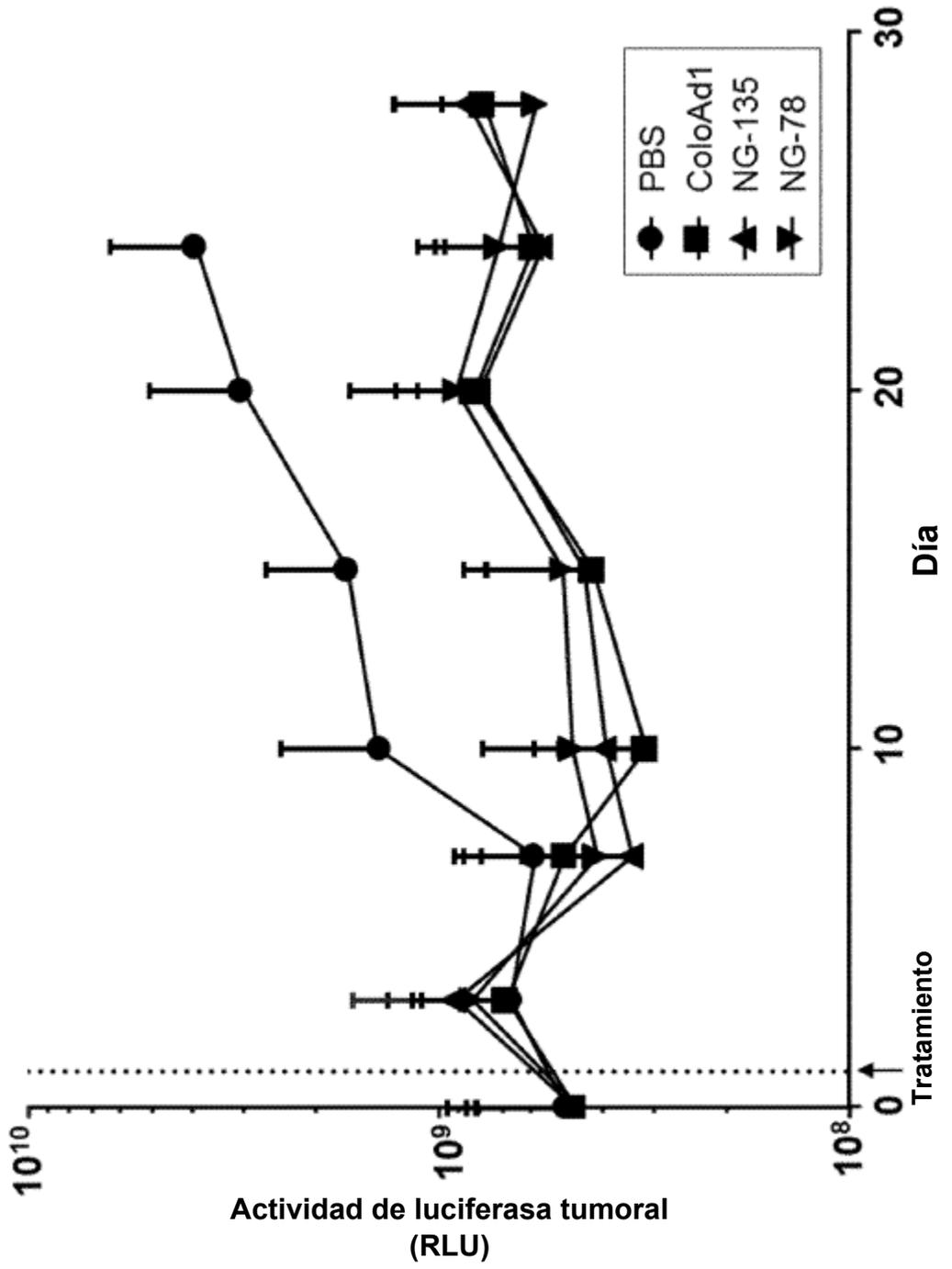


Figura 37

Figura 38

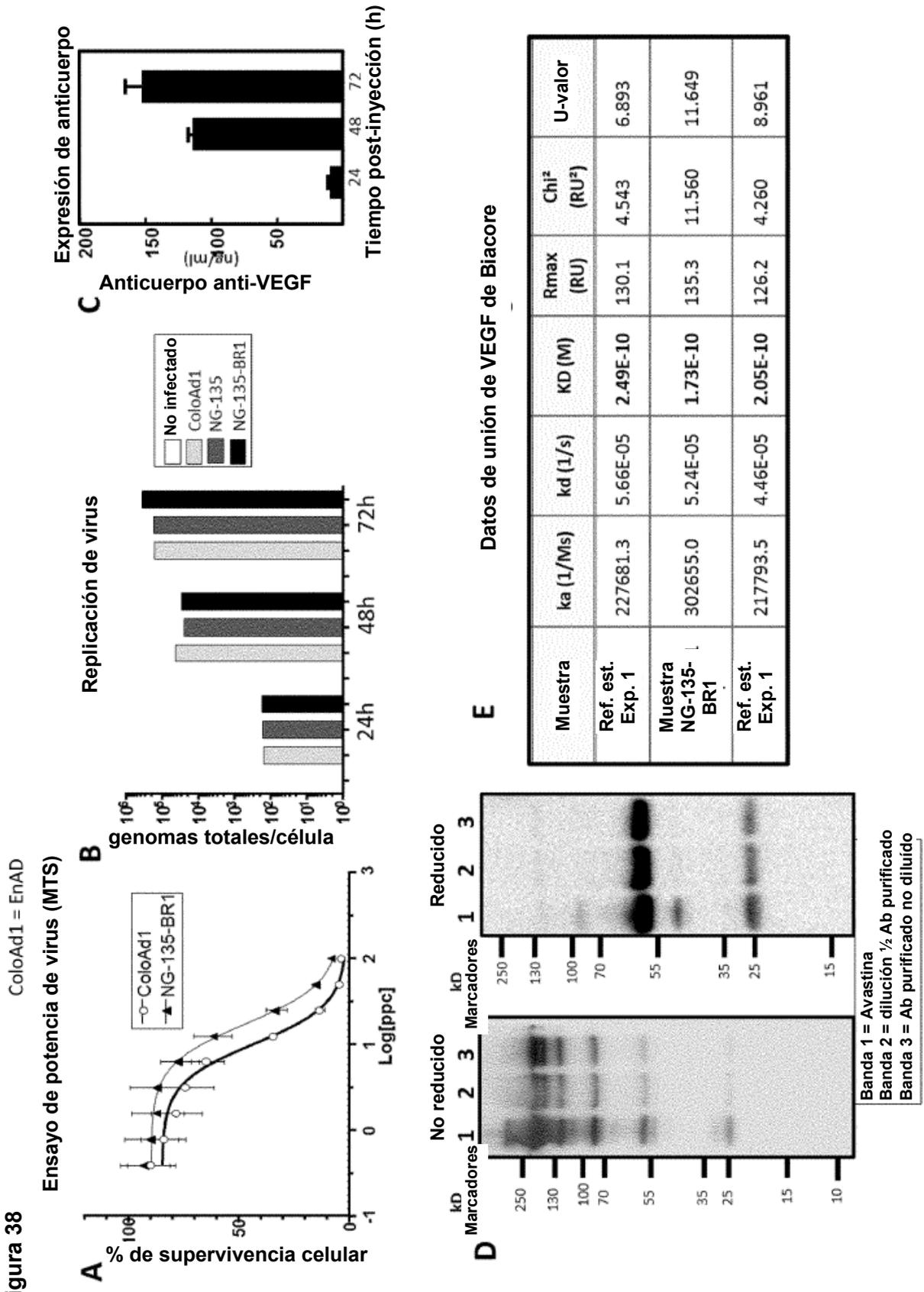


Figura 39

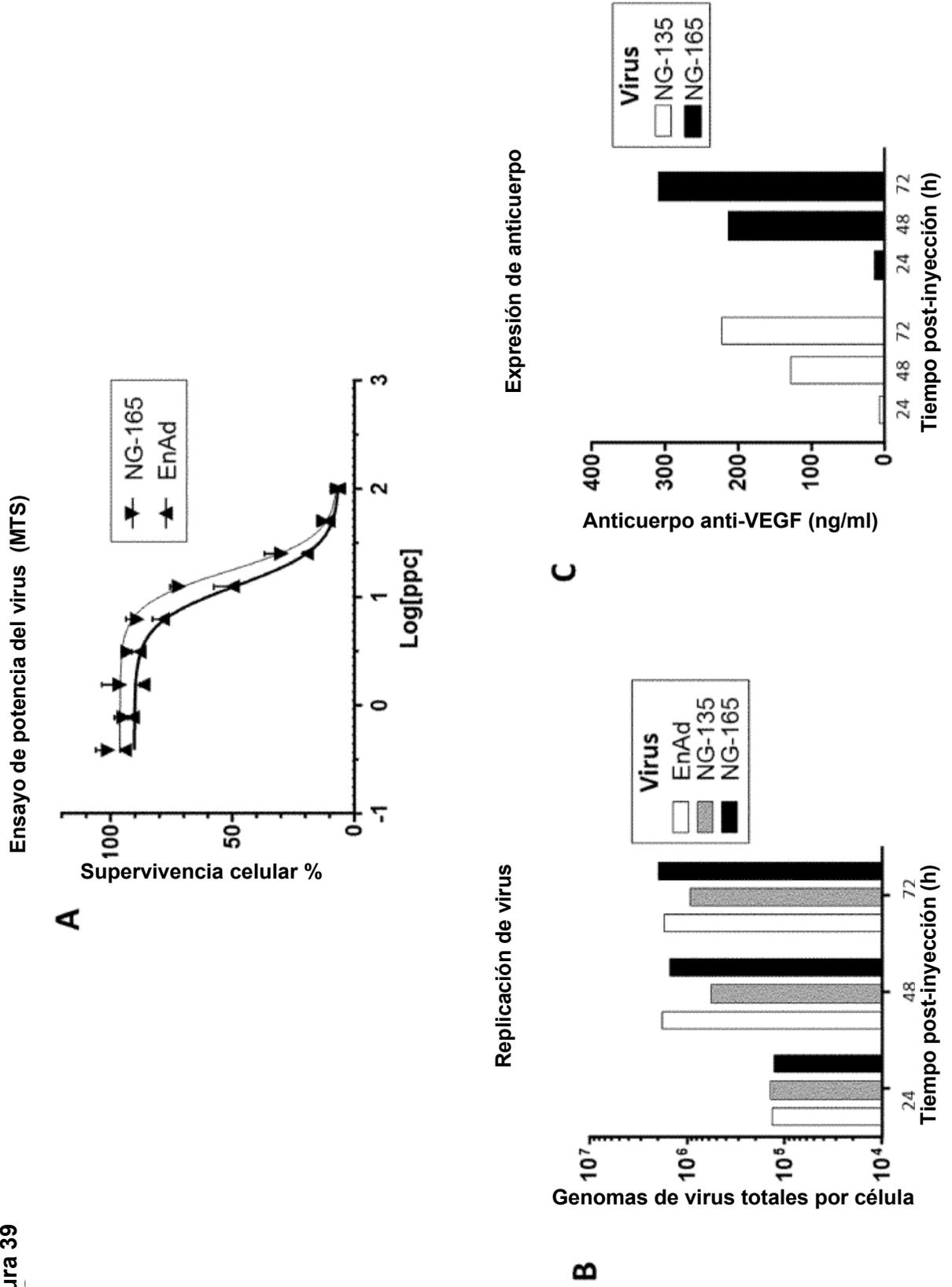


Figura 40 ColoAD1 = EnAd

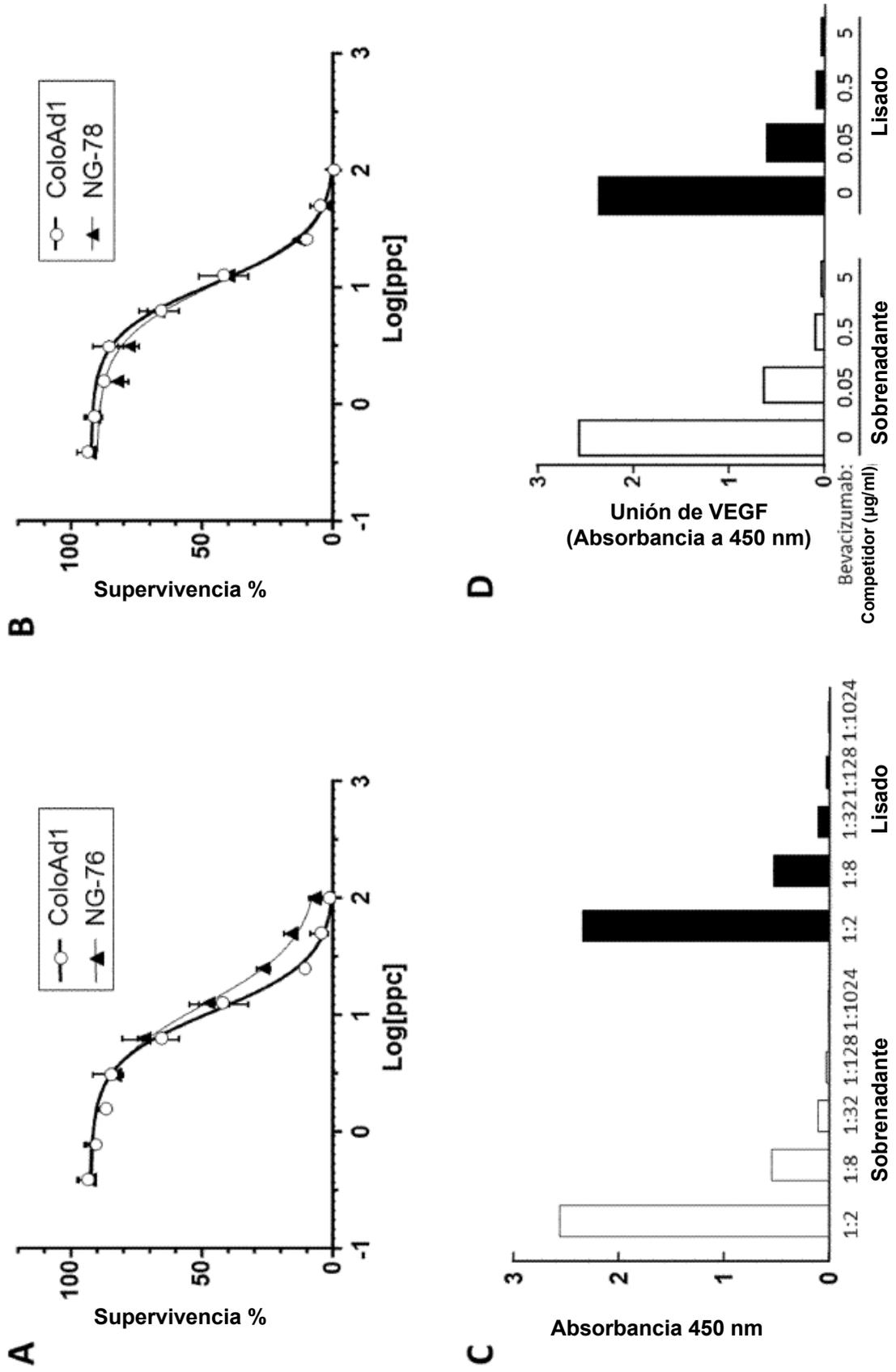
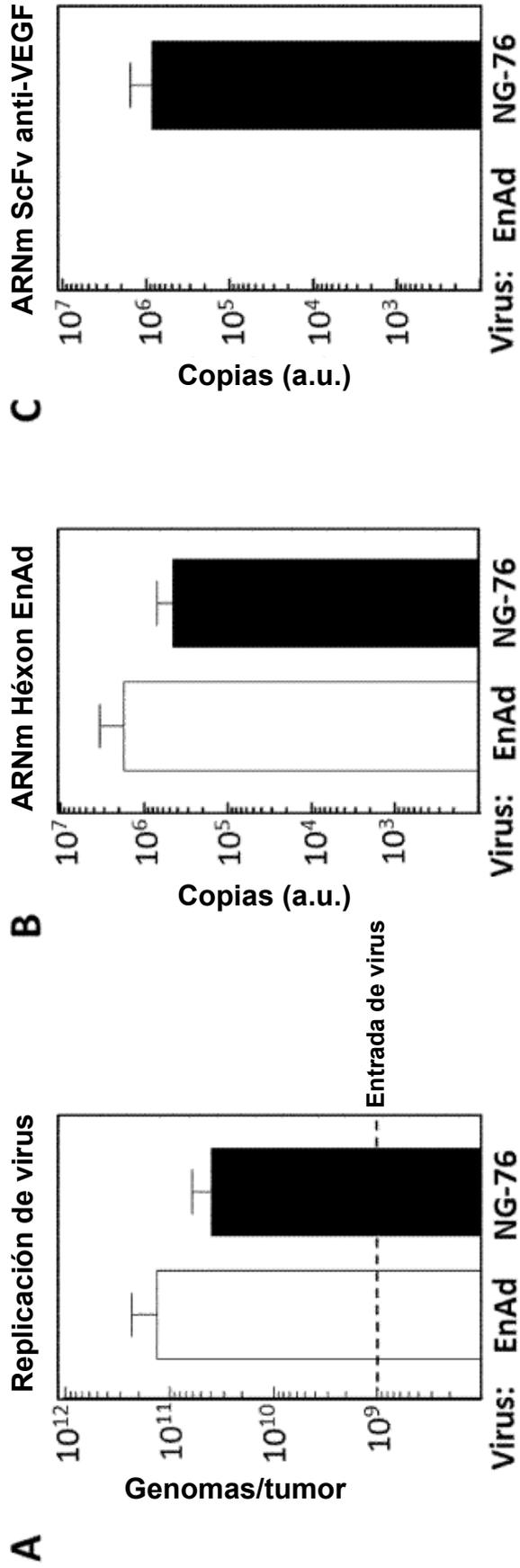


Figura 41



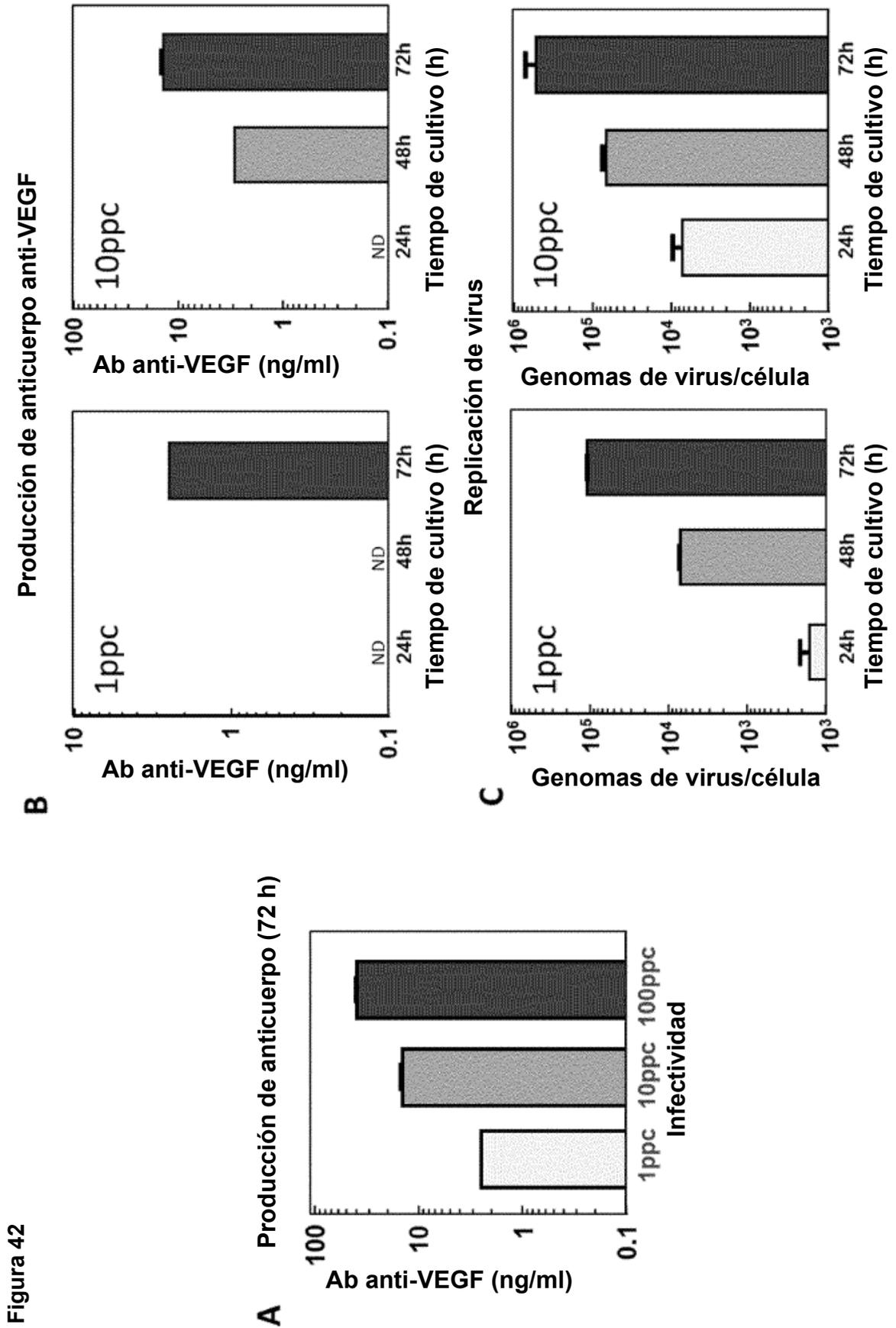


Figura 42

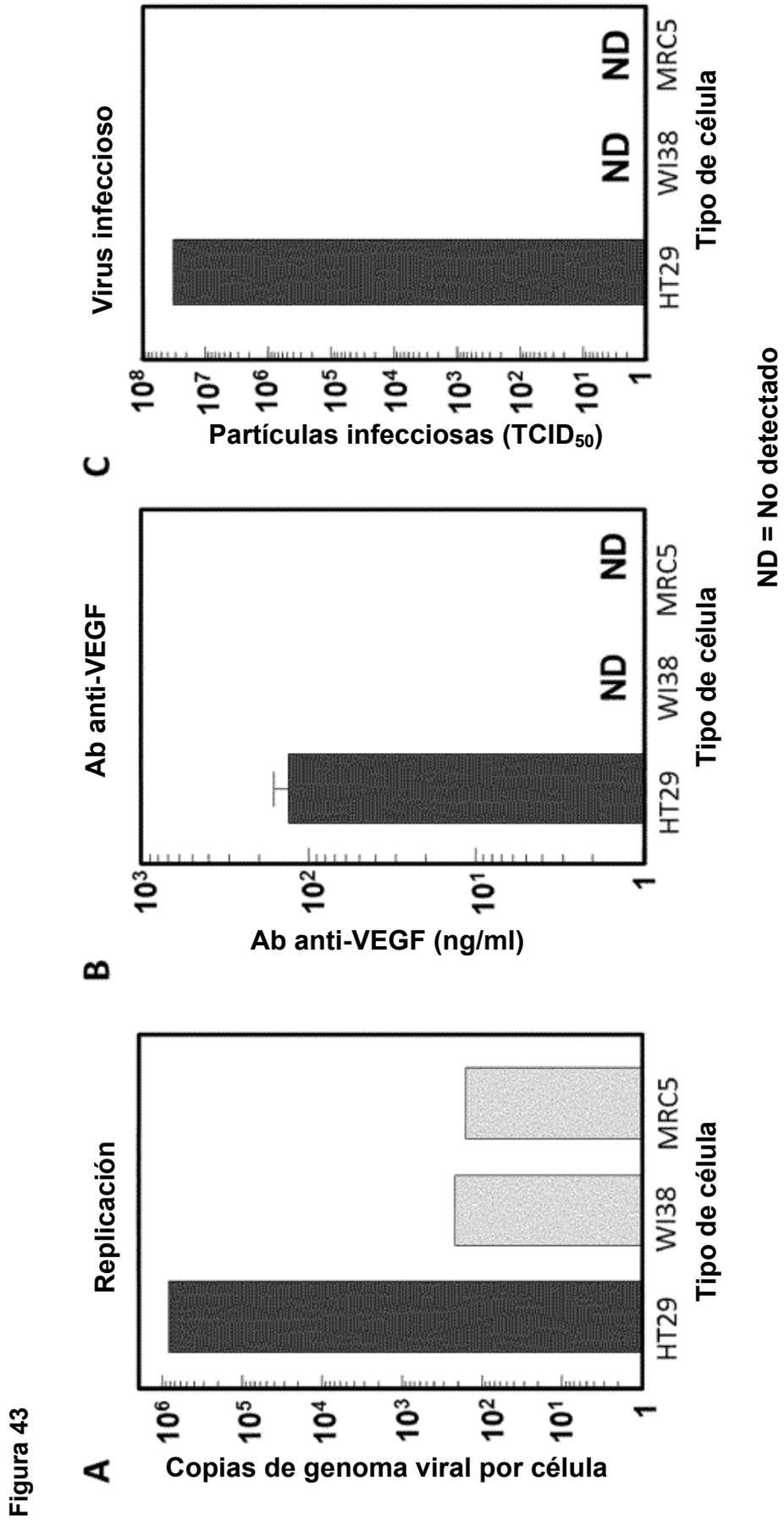


Figura 43

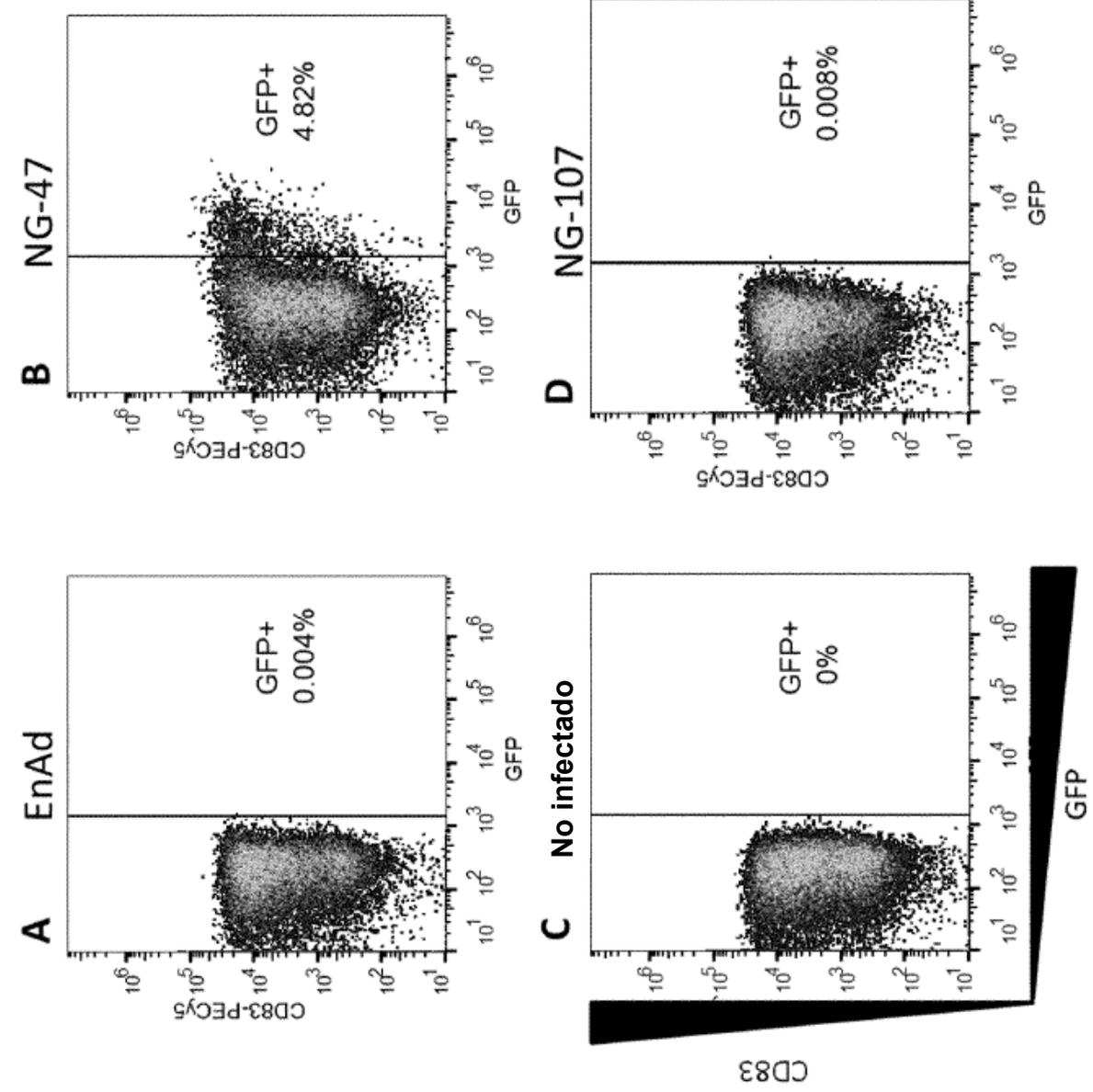


Figura 44

Figura 45

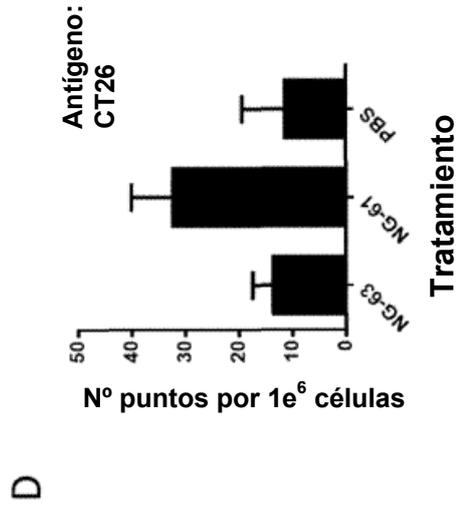
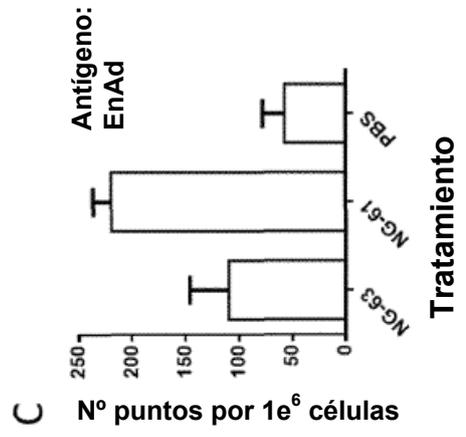
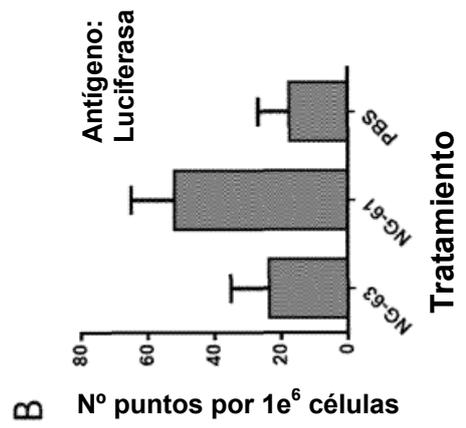
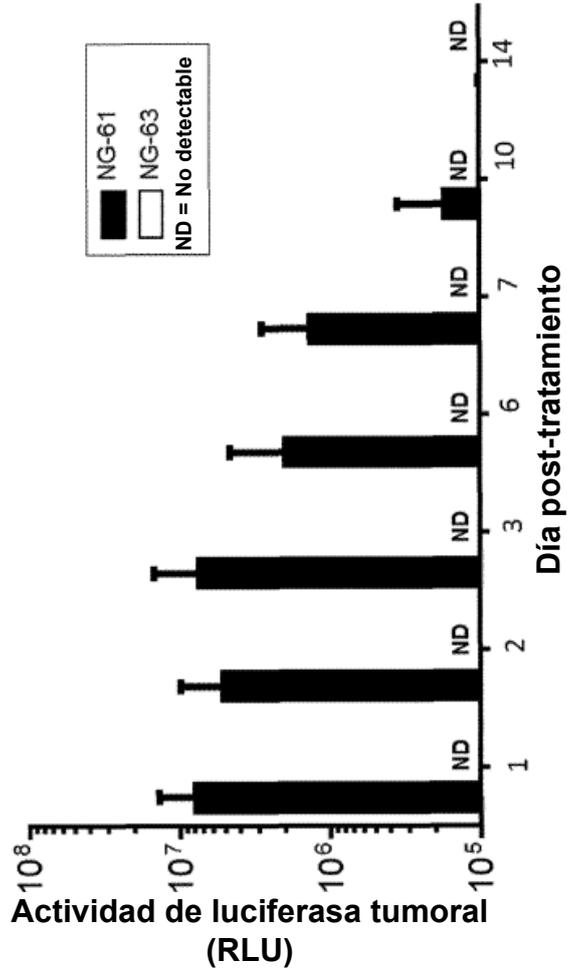


Figura 46

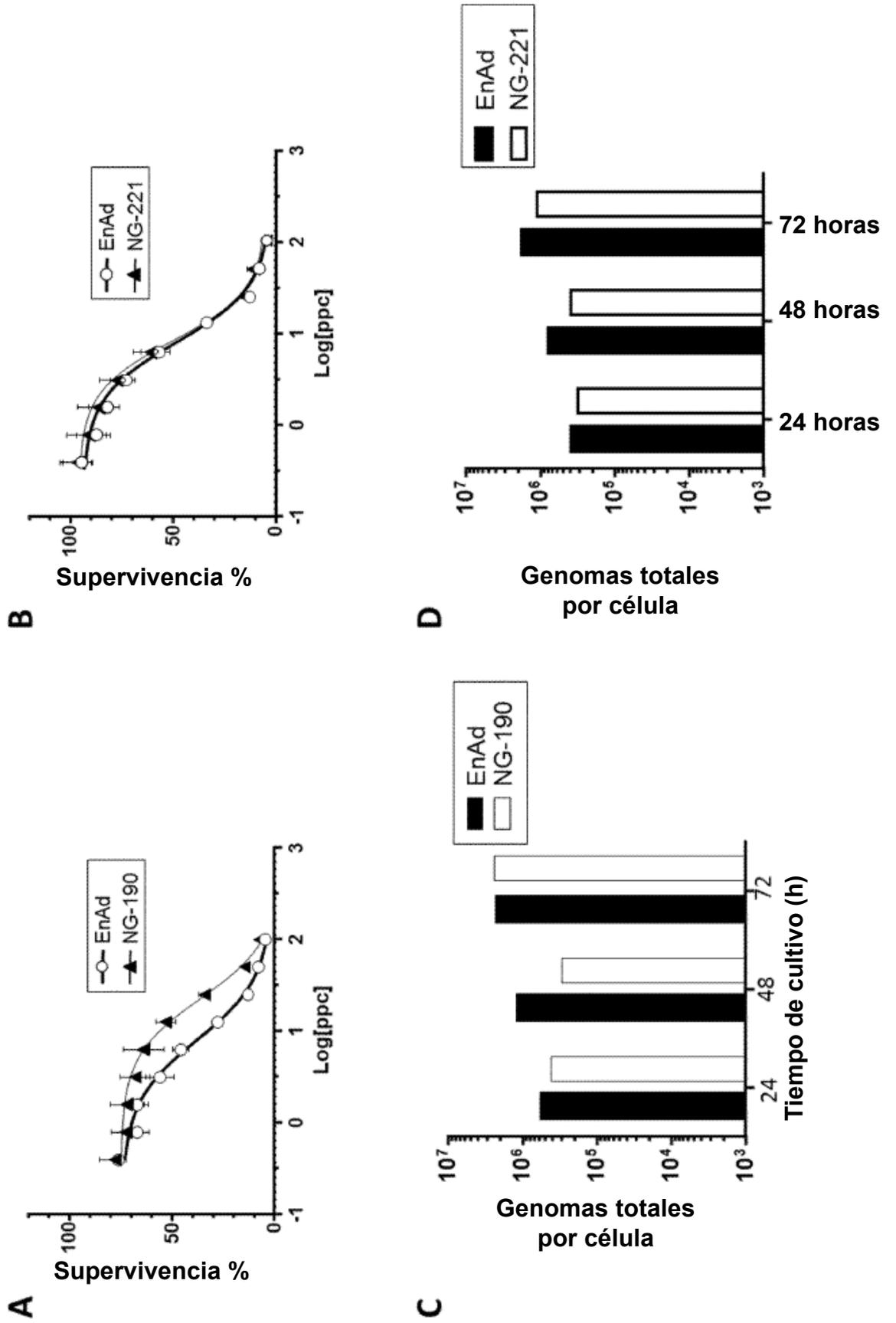


Figura 47

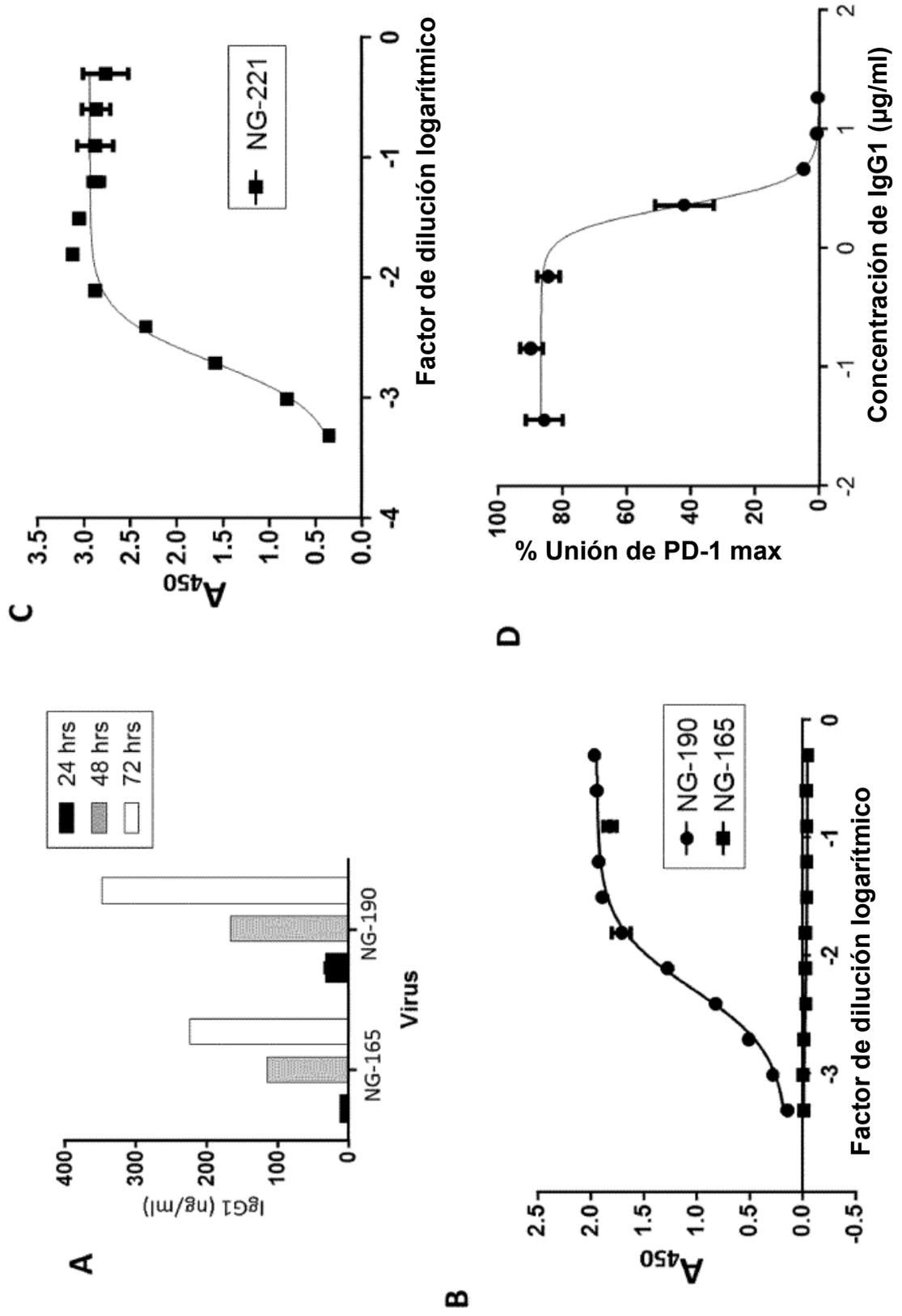
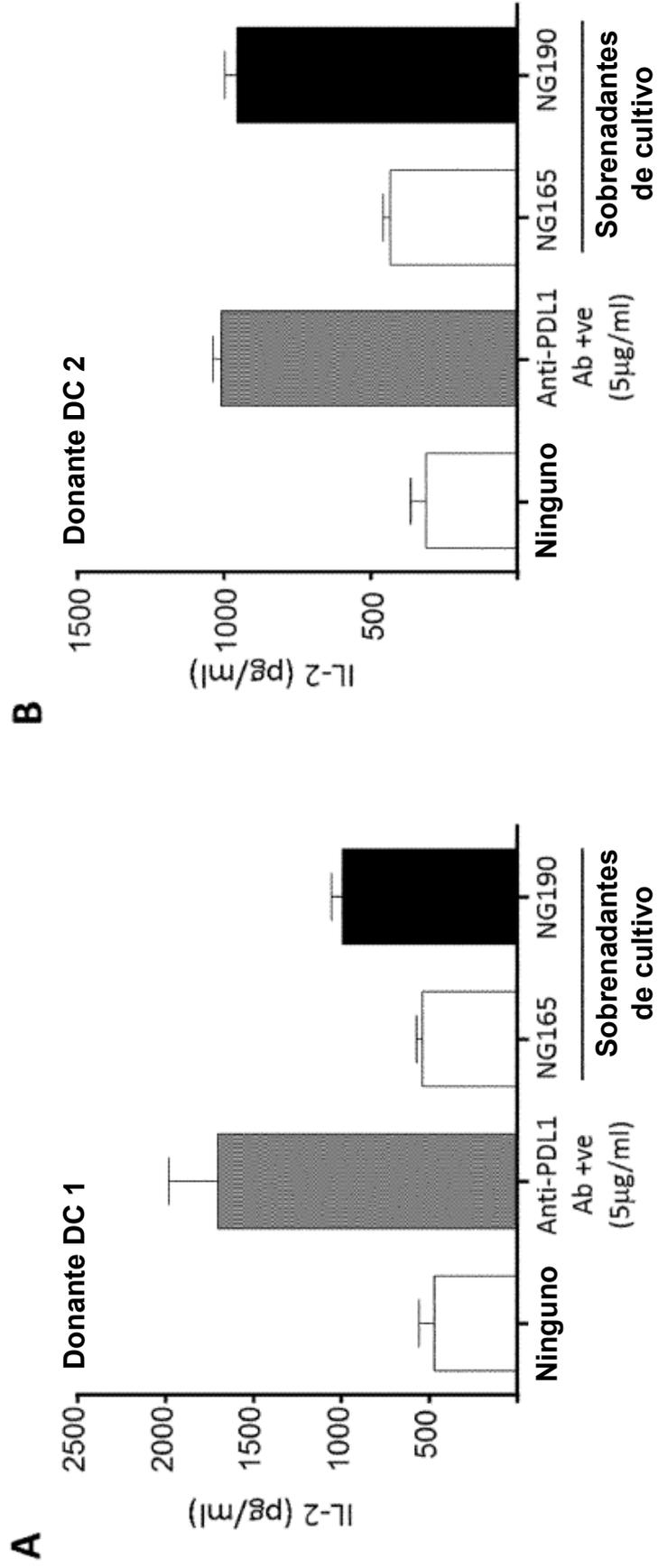


Figura 48



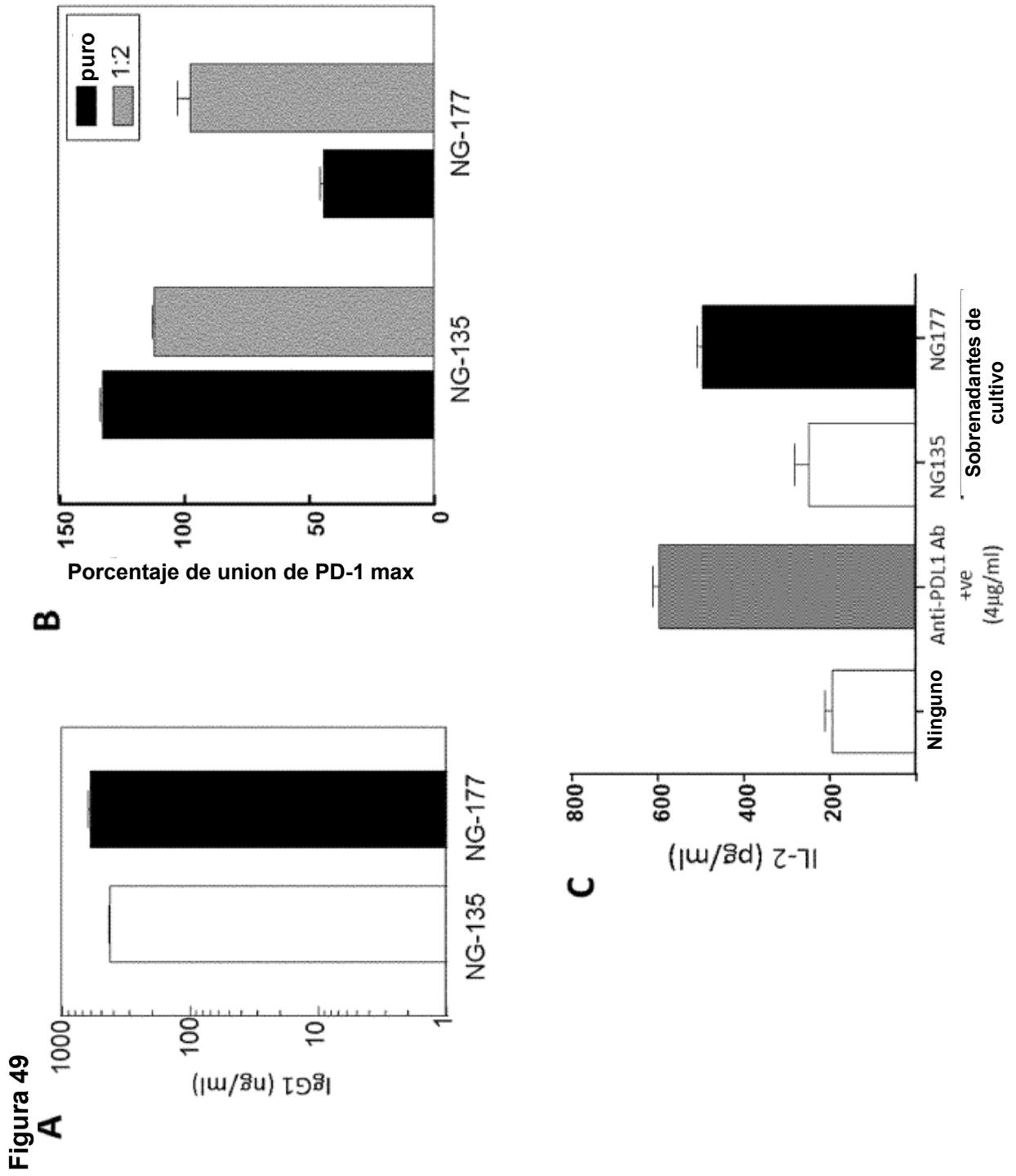


Figura 50

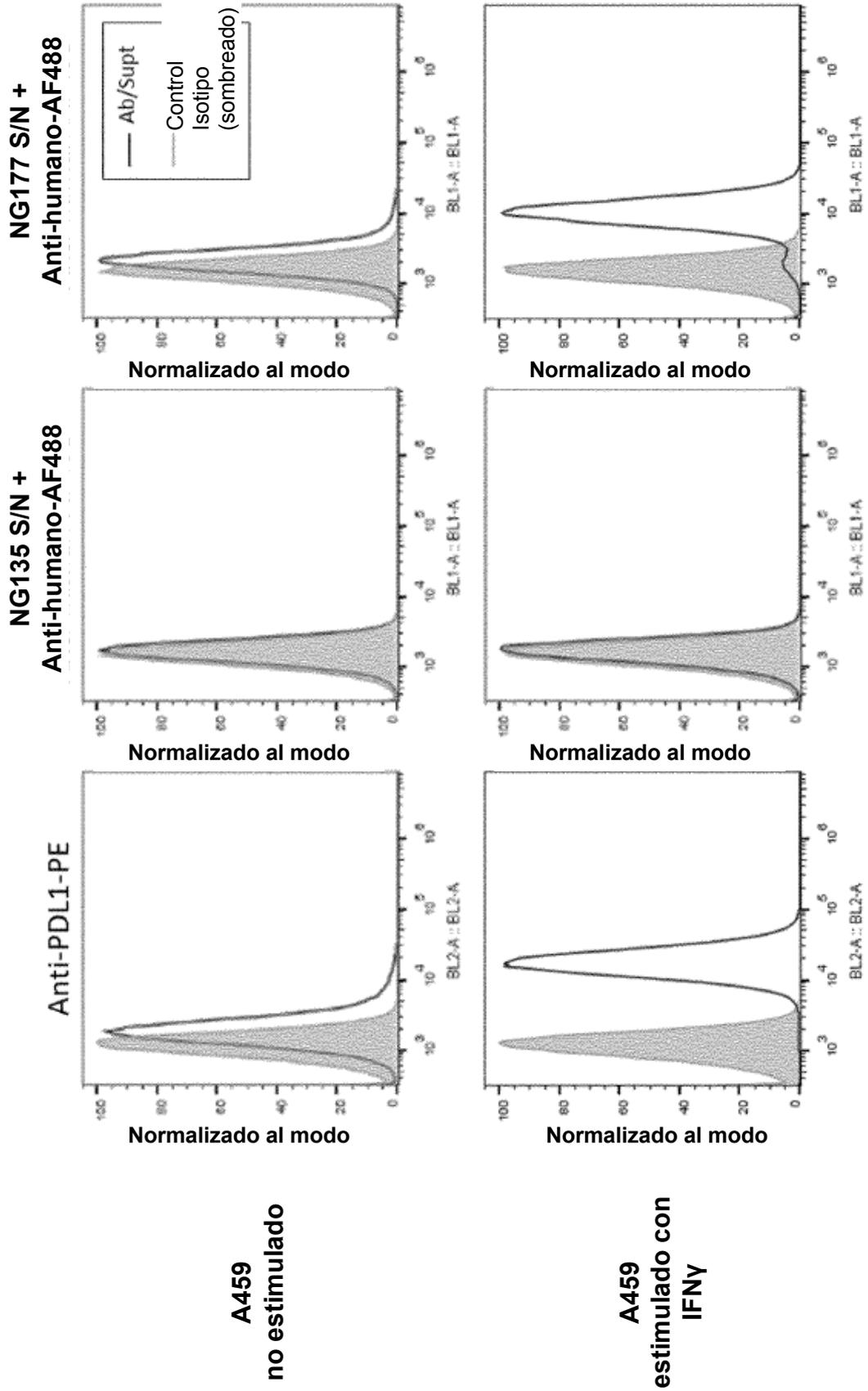
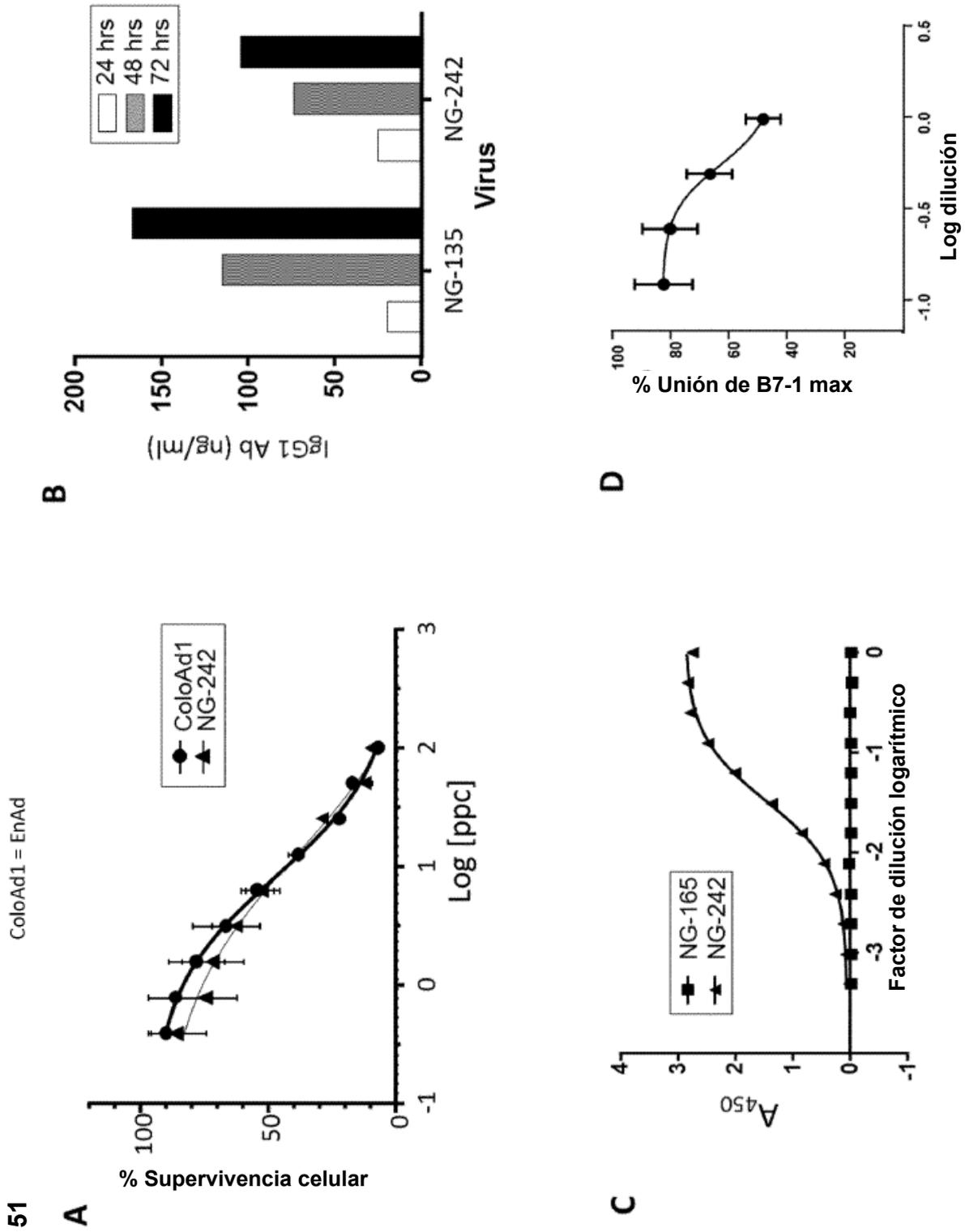
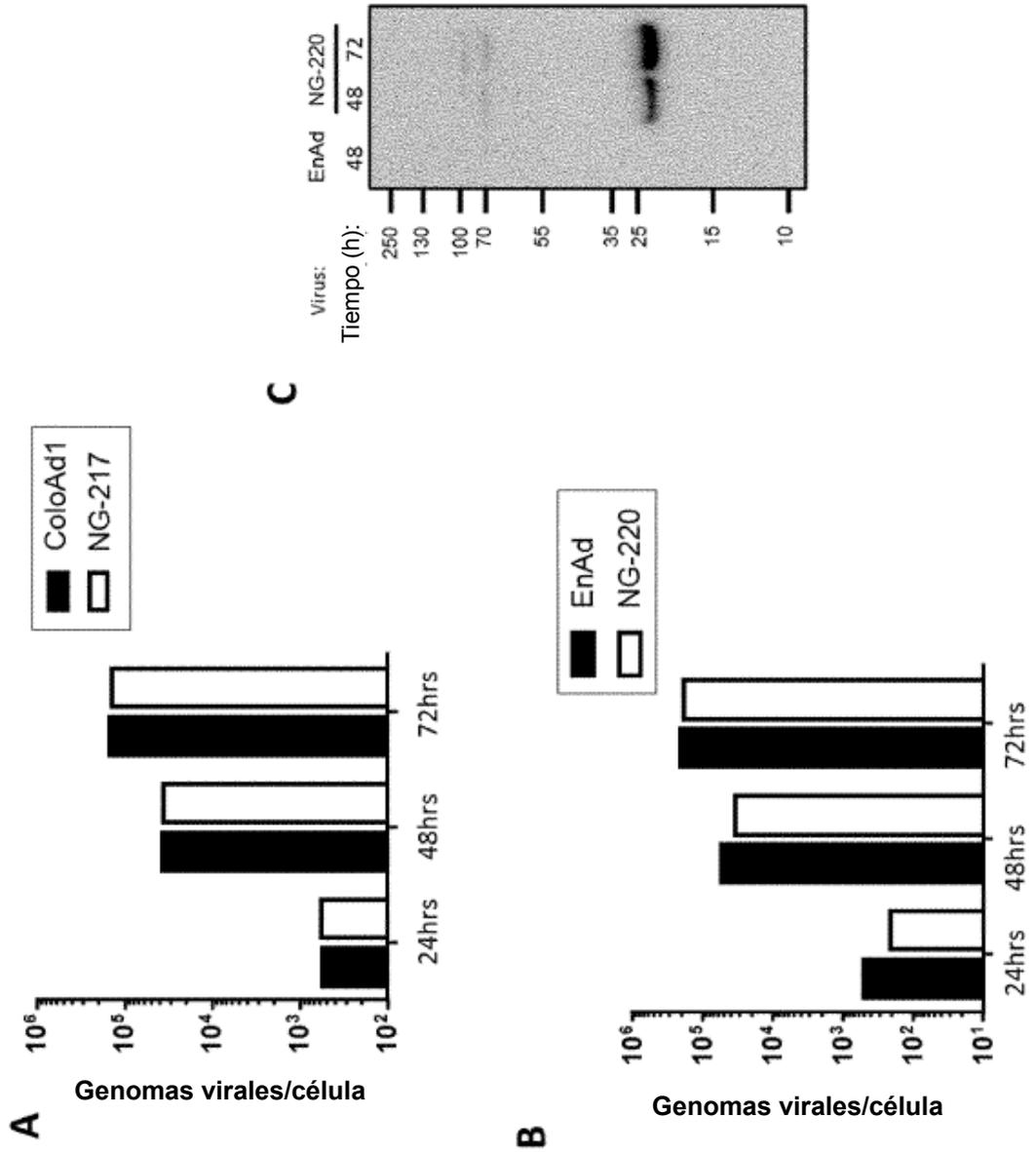


Figura 51



ColoAd1 = EnAd

Figura 52



ColoAd1 = EnAd

Figura 53

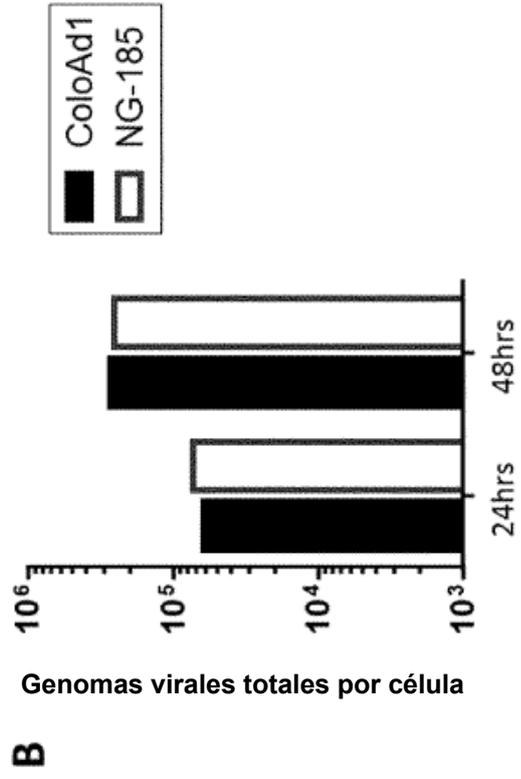
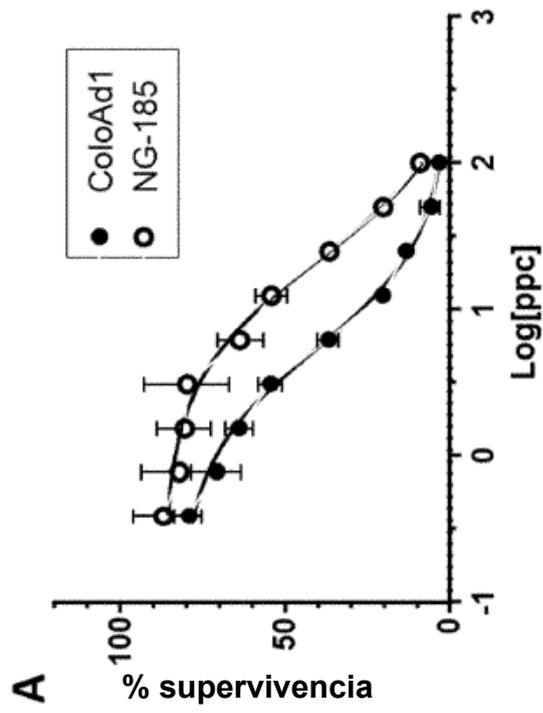


Figura 54

