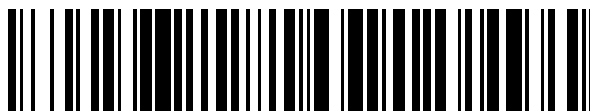


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 921**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2015** **PCT/EP2015/060903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015** **WO15177098**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2015** **E 15723503 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018** **EP 3145537**

54 Título: **Adenovirus oncolíticos recubiertos para vacunas contra el cáncer**

30 Prioridad:

**19.05.2014 FI 20145449**

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

**30.05.2019**

73 Titular/es:

**VALO THERAPEUTICS OY (100.0%)**  
**Kampinkuja 2**  
**00100 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**CERULLO, VINCENZO;**  
**VÄHÄ-KOSKELA, MARKUS;**  
**HIRVINEN, MARI y**  
**CAPASSO, CRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 714 921 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 recubiertos para vacunas contra el cáncer

**5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a vectores adenovirales, donde la cápside viral se ha recubierto con polipéptidos, que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto y usos de los mismos. Además, la presente invención se refiere a métodos para tratar enfermedades, por ejemplo, cáncer, por vectores adenovirales  
 10 que han sido recubiertos por polipéptidos que causan una respuesta inmunitaria específica de péptido. Además, la presente invención se refiere a un método para recubrir vectores adenovirales mediante péptidos específicos, así como a un método para identificar aquellos péptidos adecuados para recubrir la cápside de un vector adenoviral.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 El cáncer es una enfermedad letal que necesita tratamientos más efectivos. Los virus oncolíticos son de gran interés ya que tienen el potencial de ser más seguros y más efectivos que cualquier otra terapia convencional. Sin embargo, en pacientes con cáncer el efecto terapéutico global ha sido modesto. Hay muchos estudios sobre la modificación de los vectores adenovirales con el fin de encontrar herramientas óptimas para terapias. Un aspecto de la regulación de  
 20 la función de los adenovirus es modificar la superficie del virus. Tanto las modificaciones genéticas como las no genéticas de las superficies de los adenovirus son bien conocidas.

Por ejemplo, Stevenson M y col. (Cancer Gene Therapy (2007) 14, 335-345) se concentra en mejorar el suministro de vectores adenovirales a los sitios objetivo. Stevenson y col. describen un estudio donde los vectores adenovirales se  
 25 dirigen a infectar células a través de integrinas que se expresan selectivamente en células tumorales metastásicas. Para este fin, se incorporó un péptido derivado de laminina (-SIKVAV-) sobre la superficie de los virus recubiertos con polímero.

El documento WO2013/116778 describe un adenovirus inmunológicamente mejorado para el cáncer. Se modificó un  
 30 adenovirus insertando un transgén de antígeno tumoral en su genoma de manera que el antígeno tumoral se exprese durante el ciclo de replicación del virus y se presente directamente a MHC-I. Este método es muy lento y demasiado laborioso y costoso para las terapias personalizadas, porque se necesita la generación de un nuevo virus para cada antígeno tumoral diferente (por ejemplo, se debe clonar un nuevo virus para cada péptido que se desee expresar). De forma similar Wang y col. (Cancer Gene Therapy (2011) 18, 825-836) describe un adenovirus oncolítico armado con  
 35 un antígeno de cáncer que está codificado genéticamente por dicho vector.

De hecho, existe la necesidad de herramientas y métodos adenovirales simples y mejorados para terapias, especialmente para terapias personalizadas. La presente invención proporciona aplicaciones adenovirales para dirigir la respuesta inmunitaria en un sujeto mientras se usa el virus como sistema de suministro de péptidos, pero que no  
 40 implica la manipulación genética del virus.

La presente invención se refiere al uso de adenovirus oncolíticos como plataforma para suministrar péptidos específicos para pacientes y enfermedades y, en consecuencia convertir la inmunidad anticápside en una respuesta inmunitaria específica de péptido (por ejemplo, inmunidad antitumoral).

**45 BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona una nueva y potente plataforma de inmunoviroterapia personalizable (por ejemplo, inmunoviroterapia para el cáncer). Un objetivo es proporcionar un vector adenoviral con superficie viral modificada,  
 50 usos del mismo y un método para tratar una enfermedad mediante la estimulación de una respuesta inmunitaria específica de péptido (es decir, antipéptido) para resolver los problemas de, por ejemplo, terapias adenovirales ineficientes, lentas, costosas y laboriosas así como la inadecuación de las terapias adenovirales para la medicina personalizada. Los objetivos de la invención se logran mediante una disposición y un método, que se caracterizan por lo que se indica en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la invención se desvelan en  
 55 las reivindicaciones dependientes.

Mediante la presente invención, se pueden superar los problemas de la técnica anterior, por ejemplo, la falta de especificidad y el dominio inmunitario de los adenovirus oncolíticos.

Las respuestas inmunitarias generadas por la infección por adenovirus se dirigen principalmente al virus y no al tumor. Además, la mayoría de la inmunidad viral está dirigida contra las proteínas de la cápside. La presente invención superará estos problemas. De hecho, la presente invención se basa en la idea de que el recubrimiento de la cápside viral con péptidos derivados de proteínas tumorales desvía la inmunidad viral hacia el tumor (**Figura 3**). Los péptidos restringidos por el complejo principal de histocompatibilidad I (MHC-I) montados en la cápside del adenovirus oncolítico, desvían la inmunidad de la cápside hacia la inmunidad antitumoral.

Simplemente, cuando el(los) péptido(s) y el(los) virus se administra(n) como una sola entidad físicamente vinculada, tanto la señal de peligro (virus) como el antígeno de tumor (péptido) entrarán en la misma célula presentadora de antígenos para lograr un efecto antitumoral máximo. La experiencia clínica ya ha indicado que la vacunación con péptidos solo conduce solo a una respuesta inmunitaria transitoria y subóptima que no puede controlar el crecimiento del tumor<sup>1</sup>. En consecuencia, mientras que los virus oncolíticos son prometedores como monoterapia, la respuesta inmunitaria que provocan está dirigida principalmente contra el virus, no contra el tumor. Incluso si el péptido y el virus se inyectan en la misma ubicación anatómica, ya que no están unidos en una sola entidad terapéutica, ingresan de manera ineficiente en los mismos aspectos celulares que son críticos para lograr la activación inmunitaria adecuada y máxima<sup>2</sup>. La conjunción física de péptido y virus adenoviral en una sola entidad terapéutica es una mejora significativa con respecto a las tecnologías de vacunas de cáncer de péptido y virus existentes. A diferencia de los virus recombinantes de la técnica anterior diseñados para expresar un antígeno o péptido asociado a un tumor, la presente invención hace posible lograr medicamentos personalizados de una manera mucho más rápida y económica que antes. De hecho, de acuerdo con la presente invención, los péptidos unidos a una cápside viral no están codificados por el vector adenoviral.

Un aspecto de la presente invención es la tecnología que permite el control constante y rápido de la presentación del antígeno tumoral como péptidos pequeños (restringidos por MHC-I). La presente invención aprovecha los péptidos específicos del paciente y de la enfermedad (por ejemplo, el tumor), que se presentan simultáneamente en las células tumorales antes y después de la terapia adenoviral (es decir, que no se enmascaran ni se eliminan después de la terapia) y en las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) después de la terapia adenoviral. Después de la identificación de estos péptidos específicos, se pueden sintetizar y montar en la cápside de adenovirus oncolíticos para lograr una alta inmunidad antitumoral. De esta manera, es posible garantizar que el tumor sea dirigido de manera efectiva por las células T citotóxicas (CTL, por sus siglas en inglés) también después de la viroterapia, por lo que el escape inmunológico se vuelve imposible ya que el sistema inmunológico dirige al virus. A la inversa, al comparar los péptidos que aparecen en las CD después de la terapia de virus en presencia o ausencia de tumor, es posible eliminar péptidos de "solo virus" y encontrar aquellos que derivan de células tumorales que inducen la respuesta de CTL.

Se puede obtener un adenovirus recubierto personalizado en tan solo dos semanas a partir de la biopsia; esto es posible porque el aislamiento y la secuenciación de péptidos a partir de MHC, así como la síntesis automatizada, son procesos rápidos, y el virus (por ejemplo, el mismo virus de la estructura para todos los péptidos) puede almacenarse en grandes cantidades para esperar el recubrimiento. El recubrimiento en sí se realiza en una hora, después de lo cual el adenovirus recubierto está listo para la inyección. Esta es una característica muy particular de nuestro sistema, ya que evita cualquier manipulación genética del virus que ralentiza el proceso, lo que hace imposible el "enfoque personalizado de la vacuna".

La presente invención también hace posible descubrir novedosos péptidos inmunogénicos específicos de tumores.

Además de la terapia contra el cáncer, el adenovirus recubierto de la presente invención se puede usar para tratar cualquier otra enfermedad en una situación donde se necesita una respuesta inmunitaria más alta y específica del péptido.

La presente invención se refiere a un vector adenoviral oncolítico que comprende polipéptidos unidos a la cápside viral donde dichos polipéptidos pueden estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto, y además donde los polipéptidos no han sido codificados genéticamente por dicho vector adenoviral pero se han unido a la cápside de forma covalente o no covalente donde los polipéptidos unidos a la cápside viral son al mismo tiempo específicos del complejo de histocompatibilidad principal de clase I (MHC-I, por sus siglas en inglés) o específicos del complejo de histocompatibilidad principal de clase II (MHC-II) y polipéptidos específicos de tumores.

Además, la presente invención se refiere a un método para recubrir la cápside de un adenovirus, donde dicho método comprende unir polipéptidos, que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto, a la cápside adenoviral de forma covalente o no covalente. La presente invención también se refiere a un método para modificar la cápside de un adenovirus, donde dicho método comprende la unión de polipéptidos

modificados con polilisina a la cápside adenoviral de forma covalente o no covalente, donde el vector adenoviral modificado es capaz de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto.

Aun así, la presente invención se refiere al uso de polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos modificados con polilisina), que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto, para recubrir la cápside de un adenovirus mediante la unión o enlace covalente o no covalente de los polipéptidos a la cápside.

Aun así, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el vector adenoviral de la invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A continuación, la invención se describirá con mayor detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

la Figura 1 muestra un esquema de la presente invención, donde el adenovirus modificado es capaz de replicar y matar células cancerosas mientras que desvía la respuesta inmunitaria antiviral contra el tumor.

La Figura 2 muestra inmunodominancia de la respuesta anti-adenovirus (barra izquierda) frente a la respuesta del tumor (barra derecha) **Ratones** Los ratones C57BL/6 con tumor B16-OVA se trataron con PBS (simulado), Ad5D24 (virus oncolítico no modificado) y (Ad5D24-CpG, un virus oncolítico más inmunogénico). Se recogieron células T del tumor y se realizó ELISPOT de IFNgamma para evaluar la respuesta antitumoral y la respuesta anti-adenovirus. **Pacientes con cáncer** La ELISPOT de IFNgamma se realizó en las PBMC de pacientes tratados con un adenovirus oncolítico armado con GMCSF (Ad5D24-GMCSF)<sup>15</sup>. Se usaron péptidos derivados de Ad5 (antivirales) y péptidos derivados de survivina (antitumorales) para estimular las PBMC antes del ELISPOT.

La Figura 3 pone de manifiesto que los adenovirus recubiertos de la presente invención representan una ventaja frente a la tecnología existente. A) El adenovirus oncolítico tiene la capacidad de provocar que las APC presenten no solo antígenos virales (que conducen a una respuesta antiviral) (otro antígeno presentado en la célula de la Figura A) sino también, como efecto secundario, antígenos tumorales (otro antígeno presentado en la célula de la Figura A) que conduce a la inmunidad antitumoral. Las células T antitumorales están marcadas como las dos células más bajas del grupo de células T. B) Los adenovirus recubiertos de la presente invención favorecerán la presentación de antígenos tumorales (marcados como ambos antígenos presentados en la célula de la Figura B) porque su cápside está cubierta por antígenos específicos de tumores (péptidos) listos para usar de MHC-I. De esta manera, la inmunidad contra la cápside puede revertirse a inmunidad antitumoral. Las células T antitumorales están marcadas como las cuatro células más bajas del grupo de células T. Como se usa en este documento, APC se refiere a células presentadoras de antígeno, TAA se refiere a antígeno asociado a tumor y "activación de PRR" se refiere a activación de receptor de reconocimiento de patrón. Las PRR son proteínas expresadas por células del sistema inmunitario innato para identificar patrones moleculares asociados a patógenos, que están asociados, por ejemplo, con patógenos microbianos.

La Figura 4 muestra las redes de funciones biológicas reguladas positivamente de células dendríticas expuestas al adenovirus oncolítico. Las células dendríticas primarias humanas se recogieron y se cultivaron durante dos semanas con IL4 y GMCSF. Las células se pulsaron con un adenovirus oncolítico (Ad5D24) a 10PV/célula. 72 horas más tarde, se recogió el ARN total y se analizó en Agilent SurePrint G3 8x60k humano (ARNm). Luego se analizaron los datos con el software Ingenuity Pathway.

La Figura 5 muestra un esquema que representa el descubrimiento de novedosos péptidos restringidos por MHC-I asociados a tumores inmunogénicos. Diferentes condiciones nos permiten relacionar los péptidos, que el tumor está expresando, con el péptido del mismo tumor que presentan las células dendríticas. Esta es una característica clave en el sistema para facilitar la identificación de péptidos inmunogénicos. A) Las células dendríticas se pulsaron con un oncolisado de tumor para permitir la presentación de antígenos tumorales. B) Las células dendríticas no pulsadas se maduraron y se analizaron. Esto sirve como control para eliminar posteriormente los autopéptidos presentados por las DC. C) Se infectó la línea celular del tumor infectado (igual que la condición A) con adenovirus oncolíticos y se analizó antes de la lisis completa (menos de 48 horas). Esta condición nos ayuda a discriminar si el adenovirus tiene un impacto significativo en la calidad de los antígenos tumorales presentados. D) Este es un tumor no infectado que presenta antígenos tumorales y autopéptidos (por supuesto, estos dos pueden ser los mismos) en MHC-I.

La Figura 6 muestra un esquema de virus recubiertos específicos de OVA. A) En este caso, como conocemos todo el péptido procesado de la ovoalbúmina de pollo (OVA), recubrimos el virus con un péptido inmunogénico específico de OVA (SIINFEKL) (SEQ ID NO:1). Luego generamos otros virus recubiertos para ser usados como controles tales como SIINFDL (SEQ ID NO:2) (antagonista) y FILKSINE (SEQ ID NO:3) (aleatoria), así como virus sin recubrimiento. B) Una vez comprobada la prueba de concepto, comenzamos con el estudio

de los adenovirus de la generación II que están recubiertos con diferentes péptidos. (PeptiCRAd se refiere a un adenovirus oncolítico recubierto con péptidos).

La Figura 7 muestra un esquema que representa tres estrategias diferentes para generar el adenovirus oncolítico recubierto de péptido.

Las Figuras 8 muestran la formación de complejos entre los adenovirus oncolíticos y los péptidos específicos de tumores y la interacción entre los epítomos modificados y los adenovirus oncolíticos. La Figura 8A muestra una formación de complejo entre adenovirus oncolíticos Ad5D24 y péptidos específicos de tumores. Línea "potencial Z")  $1 \times 10^{10}$  partículas virales se conjugaron con diferentes concentraciones de péptido específico de tumor cargado positivamente. Después de la reacción, se midió el potencial Z de las partículas individuales. Línea "tamaño")  $1 \times 10^{10}$  partículas virales se conjugaron con diferentes concentraciones de péptido específico de tumor cargado positivamente. Después, se midió el tamaño de las partículas individuales y se informó en función de la concentración del péptido. Cuando el potencial Z está entre -20mV y + 20mV, hay un cambio drástico en el tamaño del complejo que muestra un alto grado de polidispersidad (probable agregación de virus), pero este estado volvió a la normalidad a una mayor concentración de péptidos, lo que sugiere que el complejo (PeptiCRAd) se completa recubierto sin posibilidad de formar un dipolo que promueva la formación de los agregados (alta polidispersidad). La Figura 8B pone de manifiesto la interacción entre el epítipo modificado MHC-I SIINFEKL y los adenovirus oncolíticos. La interacción virus/péptido se midió por SPR. Se recubrió un sensor APTES de sílice  $\text{SiO}_2$  con Ad5D24 y se inyectaron en el sistema de flujo concentraciones crecientes (0,15, 0,3, 0,6, 1,2, 2,4 y 7,2  $\mu\text{M}$ ) de SIINFEKL (línea discontinua) o poliK-SIINFEKL (línea continua). La respuesta de la señal SPR se muestra en relación con la duración del experimento.

La Figura 9 muestra que el adenovirus recubierto Ad5D24 de la presente invención (PeptiCRAd) muestra una actividad mejorada de destrucción celular en comparación con el virus oncolítico no recubierto. Ensayo representativo de la viabilidad celular (ensayo MTS) realizado en la línea celular de adenocarcinoma de cáncer de pulmón (A549). Las células se sembraron el día 0, se infectaron a la multiplicidad indicada de infección el día 1 y la prueba se detuvo y se analizó el día 3.

Las Figuras 10 muestran que el adenovirus específico de OVA mejora la inmunidad específica de OVA. Los ratones con tumores B16-OVA subcutáneos se inyectaron por vía intratumoral con: PBS, virus oncolítico (Ad5D24), virus oncolítico + péptidos SIINFEKL (no en forma de complejos), virus oncolítico + SIINFEKL (en forma de complejo como una sola entidad, PeptiCRAd). A) El crecimiento del tumor se midió y se informó en los puntos de tiempo mostrados. B) Se evaluó la inmunidad específica de SIINFEKL mediante citometría de flujo (análisis de pentámeros).

La Figura 11 muestra la uniformidad de la técnica de recubrimiento peptídico. La figura muestra la carga neta de dos adenovirus oncolíticos diferentes recubiertos con péptido modificado (6K-SIINFEKL). Los dos virus usados en este ejemplo son Ad5D24-CpG (adenovirus oncolíticos modificados genéticamente para tener su genoma rico en islas CpG) y Ad5D24-RFP, que es un adenovirus oncolítico que codifica la proteína fluorescente roja para facilitar la formación de imágenes *in vitro* e *in vivo*; (RFP se refiere a la proteína roja fluorescente).

La Figura 12 muestra la correlación entre la carga neta de PeptiCRAd y su tamaño. En este ejemplo, comenzamos con un virus desnudo (carga neta de aproximadamente - 25-30 mV) y luego añadimos concentraciones crecientes de péptidos para formar el complejo que llamamos PeptiCRAd. Muestra que cuantos más péptidos añadimos, más cambió la carga neta del virus de valores negativos a positivos, al final, cuando se formó el complejo PeptiCRAd, la carga neta del virus recubierto con el péptido fue de aproximadamente + 30-35 mV.

Las Figuras 13 muestran la presentación cruzada de análogos de SIINFEKL modificados en MHC-I adsorbidos o no adsorbidos en la cápside viral. Los bazos se recogieron de ratones C57BL/6 (H-2K<sup>b</sup>), y se preparó una suspensión de células individuales en medios de crecimiento RPMI-1640 con FBS al 10 %. (A) Un total de  $2 \times 10^6$  esplenocitos se incubaron con 200  $\mu\text{l}$  de medio que contiene SIINFESL no modificado (control positivo), SIINFEKL-AHX-poliK que contiene ácido caproico (control negativo), SIINFEKL-poliK extendido en el extremo C, o el poliK-SIINFEKL extendido en el extremo N (0,19  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Después de 2 horas de incubación a 37 °C, las células se lavaron y se tiñeron con APC antiH-2K<sup>b</sup> unido a SIINFEKL o control de isotipo. (B) Similar a (A), los esplenocitos murinos frescos se infectaron con OVA-PeptiCRAd (100 pv/célula + 37,5  $\mu\text{g}$  de péptido) y 37,5  $\mu\text{g}$  de SIINFEKL (control positivo) o poliK-SIINFEKL. Después de 2 horas de incubación, las muestras se lavaron y analizaron por citometría de flujo. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (n = 2). La significación se evaluó usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni; \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

Las Figuras 14 muestran que PeptiCRAd conserva la actividad oncolítica intacta y muestra una mayor infectividad en líneas celulares con baja expresión de CAR. (A) Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^4$  células por pocillo y se infectaron con OVA-PeptiCRAd o Ad5D24 desnudo usando diferentes relaciones

pv/células (0,1, 1, 10 y 100). El péptido poliK-SIINFEKL (línea discontinua, círculos) se incluyó como control. La viabilidad celular se determinó luego por el ensayo MTS. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (n = 3). (B) Estudio de infectividad por ICC. Un total de  $2 \times 10^5$  células por pocillo se sembraron en una placa de 24 pocillos y se infectaron con 100  $\mu$ l de dilución viral (10 pv/célula) que contiene OVA-PeptiCRAd o Ad5D24 (control) al día siguiente. Después de dos días de incubación, se realizó ICC anti-hexón y se adquirieron cinco imágenes no superpuestas usando un microscopio digital. Se presenta el número medio de manchas por campo visual. Los datos de un experimento representativo se muestran como la media  $\pm$  SEM (n = 2-3). La significación se evaluó usando la prueba t no pareada con la corrección de Welch; \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001.

Las Figuras 15 muestran la eficacia antitumoral de PeptiCRAd y el análisis inmunológico de células T CD8<sup>+</sup> específicas de antígeno y DC. (A) Ratones C57BL/6 (n=6) recibieron  $3 \times 10^5$  células B16-OVA en ambos flancos. El tratamiento se inició 9 días después e incluyó solución salina (simulada), péptido solo (SIINFEKL), virus solo (Ad5D24-CpG), una mezcla de virus y péptido (Ad5D24-CpG + SIINFEKL) y complejo de virus-péptido (OVA-PeptiCRAd). Los ratones fueron tratados tres veces (en los días 0, 2 y 7). Luego se midió el tamaño del tumor y se presenta como la media  $\pm$  SEM en función del tiempo. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001. Los tumores, bazo y ganglios linfáticos inguinales se recogieron a partir de ratones (n = 3-4) en dos puntos de tiempo: el día 7 (temprano) (B) y el día 16 (finales) (C). La proporción de células T CD8<sup>+</sup> específicas de SIINFEKL se determinó luego eliminando las células CD19<sup>+</sup>. El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup>OVA<sup>+</sup> se presenta como la media  $\pm$  SEM. (D) El tamaño medio del tumor al final del experimento (eje y lineal) se representó frente al porcentaje medio de células T CD8<sup>+</sup>OVA<sup>+</sup> doble positivas (log<sub>10</sub> eje x). Los valores r y r<sup>2</sup> de Pearson también se calcularon y se representaron gráficamente para cada conjunto de muestras. (E) Se determinó el cambio en las DC que mostraban un perfil maduro y una presentación cruzada de SIINFEKL en sus moléculas MHC-I. Las DC maduras se definieron como células CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>altas</sup>. APC anti-ratón H-2K<sup>b</sup> unido a SIINFEKL se usó para realizar un seguimiento de la presentación cruzada de SIINFEKL en MHC-I en el grupo seleccionado de DC.

Las Figuras 16 muestran que la dirección a dos antígenos tumorales con PeptiCRAd reduce el crecimiento de los tumores tratados y distantes no tratados. Un tumor primario fue injertado en ratones C57BL/6 en el flanco derecho usando  $1 \times 10^5$  de células de melanoma B16-F10. El tratamiento comenzó el día 10. El día 16 los ratones recibieron  $3 \times 10^5$  de células B16-F10 en su flanco izquierdo. (A) Se informa el crecimiento del tumor primario (derecho) y los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM (n = 5). La significación se determinó usando ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni; \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001. (B) El tamaño de los tumores secundarios (izquierda) al final del experimento se informa en una escala de log<sub>2</sub>. La significación se evaluó mediante la prueba U de Mann-Whitney; \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001. (C) Se recogieron los bazo y los ganglios linfáticos inguinales, y se determinó el nivel de células T CD8<sup>+</sup> específicas de TRP-2 y hgp100 en cada órgano mediante tinción con pentámero MHC-I. El porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> específicas de epítipo encontrado en cada órgano se normalizó frente al simulado y se presenta como la respuesta relativa acumulativa para cada grupo experimental.

Las Figuras 17 muestran la eficacia de PeptiCRAd en ratones humanizados con melanomas humanos. Los ratones NGS con triple eliminación recibieron  $2 \times 10^6$  de células de melanoma humano (SK-MEL-2) en cada flanco. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro medio de 4-5 mm, un grupo de ratones (n = 3) recibió PBMC humanas de un donante sano compatible con HLA-A, mientras que otro grupo de ratones (n = 2) no recibió PBMC. Los ratones fueron tratados luego (en los días 0, 2 y 4) con uno de los siguientes: i) solución salina (simulada), ii) Ad5D24-GM-CSF, y iii) MAGE-A1 PeptiCRAd. El volumen tumoral de los ratones humanizados (A) se presenta como la media  $\pm$  SEM. La significación se evaluó usando ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni; \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001. (B) Para cada grupo de ratones humanizados, se presenta el área bajo la curva (ABC) relativa al tamaño del tumor. (C) El volumen del tumor de ratones no humanizados se informa como la media  $\pm$  SEM (\*\*\*\* P < 0,0001).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### *Inmunología tumoral y el inmunoepitidoma*

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígenos profesionales derivadas de la médula ósea. Las DC son células presentadoras de antígeno óptimas para presentar epítopos de antígeno tumoral a células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. Los antígenos exógenos se pueden cargar en MHC de clase I para una "presentación cruzada" a las células TCD8<sup>+</sup>. La presentación cruzada es un fenómeno cuyo resultado está determinado por el estado de activación de las DC<sup>5</sup>. En las células cancerosas, el grado de maduración de las DC que conduce a la presentación cruzada de antígeno tumoral generalmente es muy bajo debido al microentorno tumoral hostil y la inmunosupresión derivada del tumor

también en los ganglios linfáticos locales. Estos obstáculos pueden superarse con la viroterapia oncolítica, ya que los virus que destruyen el tumor proporcionan las "señales de peligro" necesarias para impulsar la activación de DC e interfieren con la inmunosupresión del tumor para exponer los antígenos inmunogénicos ocultos<sup>6-8</sup>.

5 Los adenovirus oncolíticos, también conocidos como adenovirus de replicación condicional (CRAd, por sus siglas en inglés), están modificados genéticamente para replicar y matar solo a las células cancerosas<sup>9,10</sup>. Se sabe que la apoptosis y/o necrosis tumoral inducida por virus conduce a la liberación de grandes cantidades de proteínas asociadas a tumores que normalmente no son accesibles por las células presentadoras de antígenos, lo que impulsa la presentación cruzada eficiente por las DC asociadas a tumores en los ganglios linfáticos que drenan tumores<sup>11-13</sup>.

10

La terapia con virus del cáncer en general se ha encontrado bien tolerada, sin embargo, la eficacia global del tratamiento ha sido modesta; tras el escrutinio de los efectos inmunológicos de la viroterapia, se ha observado un claro predominio del virus sobre el tumor tanto en ratones como en seres humanos (**Figura 2**). El recubrimiento de la cápside del adenovirus con péptidos específicos de tumores restringidos por MHC-I sintéticos "engañará" a las células presentadoras de antígenos (APC) para que presenten estos antígenos tumorales como parte del virus. En otras palabras, la presente invención que utiliza la cápside de adenovirus como un almacén para suministrar péptidos restringidos por MHC-I desviaría la respuesta inmunitaria del virus y en su lugar hacia el tumor.

15

Como se usa en este documento, las moléculas del "complejo principal de histocompatibilidad de clase I" se refieren a una de las dos clases principales de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (la otra es MHC de clase II) y se encuentran en casi todas las células nucleadas del cuerpo. Su función es mostrar fragmentos de proteínas desde el interior de la célula hasta las células T; las células sanas serán ignoradas, mientras que las células que contienen proteínas extrañas serán atacadas por el sistema inmunitario. Las moléculas del MHC de clase I se unen a péptidos generados principalmente por la degradación de proteínas citosólicas por el proteasoma. El complejo MHC I:péptido se inserta luego en la membrana plasmática de la célula. El péptido está unido a la parte extracelular de la molécula de MHC de clase I. Por lo tanto, la función del MHC de clase I es mostrar proteínas intracelulares a las células T citotóxicas (CTL). Sin embargo, el MHC de clase I también puede presentar péptidos generados a partir de proteínas exógenas, en un proceso conocido como presentación cruzada. Como se usa en este documento, los "polipéptidos específicos de MHC-I" se refieren a aquellos péptidos, que se unen a MHC-I, es decir, la parte extracelular de la molécula de MHC de clase I, y se muestran a CTL.

25

30

Todos los péptidos MHC-I (MIP) se denominan colectivamente el inmunozeptidoma<sup>14</sup>. Solo recientemente, con el uso de tecnologías avanzadas ha habido la posibilidad de comenzar a investigar el inmunozeptidoma MHC-I. La diferencia crucial en la presente invención, en comparación con otras estrategias que intentan analizar ampliamente el inmunozeptidoma completo, es que la presente invención se centra en péptidos específicos que están presentes simultáneamente en las células tumorales antes y después de la terapia (es decir, que no se enmascararán ni se eliminarán después de la terapia) y en DC después de la terapia (**Figura 3**).

35

Una diferencia significativa entre la presente invención y la inmunoterapia tradicional basada en péptidos es que la presente invención aprovecha al máximo el hecho de que los virus, y en particular los adenovirus, tienen un medio privilegiado para interactuar con las DC (por lo tanto, no hay una necesidad obligatoria de identificar las DC). Los adenovirus estimulan varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR), receptores de tipo Toll<sup>16,17</sup>, la familia de receptores de tipo NOD<sup>18</sup>, e inflammasoma<sup>19</sup>, predisponiendo las DC para la presentación robusta de antígenos y la activación de CTL<sup>20</sup>. Para este fin, mostramos que las DC primarias humanas pulsadas con adenovirus oncolíticos activan las rutas involucradas en la adhesión celular, la interacción y señalización célula-célula, la maduración y la presentación de antígenos, lo que sugiere que el adenovirus es capaz de promover la maduración y la migración de células dendríticas primarias inmaduras (**Figura 4**).

45

Como se usa en este documento, "estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido" se refiere a causar una respuesta inmunitaria donde las células que representan los péptidos específicos serán atacadas y destruidas. "Respuesta inmunitaria" se refiere a un sistema que involucra linfocitos (es decir, glóbulos blancos), ya sean linfocitos T o B o ambos. Los linfocitos T atacan los antígenos directamente y ayudan a controlar la respuesta inmunitaria. También liberan sustancias químicas, conocidas como citoquinas, que controlan toda la respuesta inmunitaria. Los linfocitos B se convierten en células que producen anticuerpos. Los anticuerpos se adhieren a un antígeno específico y facilitan que las células inmunitarias destruyan el antígeno.

50

55

En una realización de la invención, uno o más polipéptidos unidos a una cápside viral se seleccionan de entre el grupo que consiste en fragmentos de proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2), fragmentos de antígeno de melanoma humano gp100 (hgp100), fragmentos de antígeno asociado a melanoma A1 (MAGE-A1), SIINFEKL, poliK-SIINFEKL, SIINFEKL-poliK, SLFRAVITK (SEQ ID NO:4), poliK-SLFRAVITK, SLFRAVITK-poliK, SVYDFVWL (SEQ ID NO:5),

60

poliK-SVYDFFVWL, SVYDFFVWL-poliK, KVPRNQDWL (SEQ ID NO:6), poliK-KVPRNQDWL y KVPRNQDWL-poliK. En una realización de la invención, un tipo o más polipéptidos unidos a una cápside viral comprenden SIINFEKL, SLFRAVITK, SVYDFFVWL o KVPRNQDWL. En una realización adicional, fragmentos de polipéptidos de TRP-2 y hgp100 (por ejemplo, SVYDFFVWL o KVPRNQDWL) están unidos a la cápside adenoviral. En una realización de la invención, los polipéptidos usados en la presente invención están modificados con polilisina (poliK). Como se usa en este documento, poliK puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en 3K-15K, 3K-10K, 3K-8K, 5K-8K, 5K-7K y 6K. Como se usa en este documento, "polipéptido modificado con polilisina" se refiere a un polipéptido, donde se ha insertado una secuencia de polilisina. La adición de una secuencia de polilisina a un polipéptido provoca un cambio en la carga del péptido y la consiguiente absorción en la superficie del virus.

### **Vector adenoviral**

Los adenovirus recubiertos con péptidos pueden ser de cualquier tipo y especie de adenovirus (por ejemplo, no limitado a adenovirus humano). En una realización de la invención, los adenovirus son capaces de replicarse y matar células cancerosas mientras desvían la respuesta inmunitaria antiviral contra el tumor (**Figura 1**). El virus que destruye el cáncer de la presente invención recubierto con péptidos inmunoactivadores específicos de tumores derivados del paciente mejora y desvía la inmunidad antiviral a inmunidad antitumoral.

Los vectores adenovirales usados en la presente invención pueden ser cualquier vector adenoviral adecuado para tratar a un ser humano o animal. Como alternativa, se pueden usar diversos tipos de vectores adenovirales de acuerdo con la presente invención. Además, los vectores pueden modificarse de cualquier forma conocida en la técnica, por ejemplo, eliminando, insertando, mutando o modificando cualquier área viral. Los vectores se pueden hacer específicos de tumores con respecto a la replicación. Por ejemplo, el vector adenoviral puede comprender modificaciones en E1, E3 y/o E4, tales como la inserción de promotores específicos de tumores, las eliminaciones de áreas y la inserción de transgenes.

En una realización de la invención, el vector adenoviral es un vector adenoviral oncolítico. Como se usa en este documento, "un vector adenoviral oncolítico" se refiere a un vector adenoviral capaz para infectar y matar células cancerosas por replicación selectiva en células tumorales frente a células normales. En una realización de la invención, los vectores son competentes para la replicación solo en células, que tienen defectos en la ruta Rb, específicamente la ruta Rb-p16. Estas células defectuosas incluyen todas las células tumorales en animales y seres humanos. Como se usa en este documento, "defectos en la ruta Rb" se refiere a mutaciones y/o cambios epigenéticos en cualquier gen o proteína de la ruta. Un adenovirus oncolítico específico del tumor se puede diseñar, por ejemplo, eliminando 24 pares de bases (D24) de la región constante 2 (CR2) de E1. Como se usa en este documento "D24" o "eliminación de 24 pb" se refiere a una eliminación de nucleótidos correspondiente a los aminoácidos 122-129 del vector de acuerdo con Heise C. y col. (2000, Nature Med 6, 1134-1139). En una realización de la invención, el vector adenoviral comprende la eliminación de 24 pb (virus oncolítico) o la eliminación del gen E1 (virus de segunda generación) o el vector es un vector dependiente del auxiliar. La eliminación del gen E1 puede ser una eliminación parcial o total de la región E1. Como se usa en este documento, un "vector dependiente del auxiliar" se refiere a un vector, que no incluye los genes que codifican las enzimas y/o proteínas estructurales requeridas para la replicación y, por lo tanto, depende de la ayuda de un virus auxiliar con el fin de replicarse.

La estructura del vector adenoviral puede ser de cualquier serotipo. En una realización de la invención, el serotipo de la estructura del vector adenoviral se selecciona de entre serotipo 3 o 5. Como se usa en este documento, "estructura del ácido nucleico del adenovirus serotipo 5 (Ad5)" se refiere al genoma de Ad5 y "estructura del ácido nucleico del adenovirus serotipo 3 (Ad3)" se refiere al genoma de Ad3.

Además, los vectores pueden ser vectores quiméricos, por ejemplo, vectores Ad5/3, Ad3/5 o Ad5/35. Como ejemplo, el "vector Ad5/3" se refiere a un vector quimérico que tiene partes de ambos vectores Ad5 y Ad3.

En una realización de la invención, el vector adenoviral comprende una modificación de la cápside (es decir, una modificación en las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas que forman la cápside del virus). "Capside" del adenovirus se refiere a la cubierta de la proteína de un virus. La cápside consiste en varias subunidades estructurales oligoméricas formadas por proteínas llamadas protómeros.

Además, se pueden modificar las áreas del botón de fibra del vector. En una realización de la invención, el vector adenoviral es Ad5/3 o Ad5/35 que comprende una estructura de ácido nucleico Ad5 y un botón de fibra seleccionado de entre el grupo que consiste en un botón de fibra Ad3, un botón de fibra Ad35, un botón de fibra quimérica Ad5/3 y un botón de fibra quimérica Ad5/35.

En una realización específica de la invención, el vector adenoviral oncolítico se basa en una estructura de ácido nucleico de adenovirus serotipo 5 (Ad5) y comprende la eliminación de D24, opcionalmente un transgén y opcionalmente un sitio CpG. En otra realización, el vector adenoviral oncolítico se basa en una estructura de ácido nucleico de adenovirus serotipo 5 (Ad5) y comprende la modificación de la cápside (por ejemplo, el botón de la fibra de Ad3), opcionalmente la eliminación D24 y opcionalmente un transgén.

La inserción de elementos exógenos puede mejorar los efectos de los vectores en las células objetivo. El uso de tejidos exógenos o promotores específicos de tumores es común en vectores recombinantes y también pueden utilizarse en la presente invención. Los promotores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, hTERT, CMV, E2F.

El vector adenoviral también puede causar la expresión de cualquier transgén(es) (por ejemplo, el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés)). En una realización de la invención, el vector adenoviral comprende uno o más transgenes. Un ejemplo de transgenes adecuados son las citoquinas, que manipulan el aumento del tráfico de células inmunitarias en el sitio afectado por la enfermedad, por ejemplo, el sitio del tumor. Las citoquinas usadas en la presente invención pueden seleccionarse de entre cualquier citoquina conocida en la técnica. En una realización de la invención, el transgén se selecciona de entre el grupo que consiste en quimioquinas y citoquinas y péptidos señal para el reclutamiento o manipulación del estroma inmunológico en el sitio del tumor, especialmente para lo que concierne a las células T, células dendríticas, macrófagos, células citolíticas naturales. Los vectores virales de la invención pueden codificar uno o varios transgenes, por ejemplo, citoquinas (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más). El vector adenoviral puede, por ejemplo, expresar anticuerpos monoclonales para bloquear específicamente puntos de control inmunitarios (por ejemplo, CTLA4, PD1, PDL1).

Un transgen(s) se puede colocar en diferentes posiciones del vector adenoviral. El transgén se puede colocar, por ejemplo, en una región E3 eliminada parcial o totalmente, ya sea bajo el promotor E3 o un promotor exógeno, o en una región E1 eliminada parcial o totalmente, bajo el promotor E1 o un promotor exógeno.

En una realización de la invención, el vector adenoviral para el recubrimiento es Ad5D24, Ad5D24CpG o Ad5D24-GMCSF. En Ad5D24-GMCSF, el transgén GM-CSF está en el lugar de la región E3 eliminada (es decir, 6.7K/gp19K eliminada) bajo el control del promotor E3 (Cerullo V y col. 2010, Cancer Research 70: 4297-4309). Como se usa en este documento, CpG se refiere a los restos CpG añadidos al genoma del adenovirus para hacer que el virus sea más inmunoestimulador. La inserción de regiones ricas en CpG en la estructura de adenovirus aumenta la capacidad del adenovirus para estimular TLR9 en células presentadoras de antígeno, por lo que aumenta la estimulación y maduración de las células T así como también la activación de NK (Nayak S, Herzog RW Gene Ther. 2010 Mar; 17(3):295-304.).

Los vectores virales utilizados en la presente invención también pueden comprender otras modificaciones que las descritas anteriormente. Cualquier componente o modificación adicional puede ser usado opcionalmente pero no es obligatorio para la presente invención.

#### **Recubrimiento del vector adenoviral**

De acuerdo con la presente invención, la cápside de un adenovirus está recubierta con polipéptidos o péptidos sintéticos, que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto. Los polipéptidos usados para recubrir los vectores adenovirales no han sido codificados genéticamente por dichos vectores adenovirales. En este documento, los términos "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud.

Los polipéptidos se pueden unir a la cápside mediante cualquier método químico o bioquímico adecuado conocido. En una realización de la invención, los péptidos se han unido covalente o no covalentemente a la cápside viral. En otra realización de la invención, los polipéptidos se han unido a la cápside por enlace electrostático, disulfuro o amida o se han suministrado conjuntamente y se han unido a la cápside en una sola nanopartícula. La(s) nanopartícula(s) también pueden estar unidas covalente o no covalentemente, por ejemplo, por enlace electrostático, disulfuro o amida, a la cápside. Como se usa en este documento, "nanopartículas" se refiere a cualquier partícula, que tiene un tamaño de entre 1 y 100 nanómetros. La estrategia de enlace electrostático aprovecha el hecho de que la cápside del adenovirus tiene una carga neta total negativa, esto implica una síntesis de péptidos cargados positivamente que consiste en polilisina unida a un pequeño enlazador que se une al péptido de interés. La primera estrategia tiene dos ventajas potenciales: 1) Es rápida (por ejemplo, aproximadamente 15-30 minutos a temperatura ambiente o aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente), lo que puede ser una característica clave en fármacos

personalizados y 2) la transducción de adenovirus en complejo con polímeros catiónicos se incrementa significativamente<sup>26,29</sup>.

Los polipéptidos unidos a la cápside viral pueden ser todos los mismos péptidos o péptidos diferentes seleccionados de entre dos o más tipos de antígenos tumorales diferentes. En una realización de la invención, los adenovirus están recubiertos con más de un tipo de péptidos. Los péptidos pueden ser, por ejemplo, diferentes polipéptidos específicos de MHC-I del mismo antígeno, polipéptidos de MHC-I de diferentes antígenos o una combinación de péptidos restringidos por MHC-I y MHC-II. En una realización de la invención, los polipéptidos unidos a la cápside viral se seleccionan de entre el grupo que consiste en polipéptidos específicos del complejo de histocompatibilidad principal de clase I (MHC-I) (polipéptidos que se unen a MHC-I), polipéptidos específicos del complejo de histocompatibilidad principal de clase II (MHC-II) (polipéptidos que se unen a MHC-II), polipéptidos específicos de enfermedad (polipéptidos asociados con una enfermedad), polipéptidos específicos de tumores (polipéptidos asociados con tumores o un tumor específico) y polipéptidos específicos de DC (polipéptidos que se unen a DC). En una realización específica de la invención, los polipéptidos unidos a la cápside viral son péptidos restringidos por MHC-I específicos de tumores. Estos péptidos pueden aislarse directamente del tumor de pacientes con un proceso descrito en la Figura 5. Utilizando el método de la Figura 5 los polipéptidos que se unen a la cápside viral pueden presentarse simultáneamente en el MHC-I del tumor y de las DC que se han alimentado con oncolisato tumoral. Como se usa en este documento, "polipéptidos específicos de tumor" se refiere a polipéptidos que son presentados por células tumorales. Como se usa en este documento, "polipéptidos específicos de DC" se refiere a polipéptidos que son presentados por DC. Como se usa en este documento, "polipéptidos específicos de enfermedad" se refiere a polipéptidos que son presentados por células que tienen un fenotipo de enfermedad o están infectados por la enfermedad.

Los polipéptidos que se unen a la cápside de un vector adenoviral incluyen cualquier polipéptido que sea presentado al mismo tiempo por enfermedades o células tumorales y células dendríticas de un paciente (por ejemplo, antígenos tumorales o péptidos derivados de ellos). Ejemplos de péptidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, gp100.

La concentración de polipéptidos en la cápside puede variar y, en una realización de la invención, los polipéptidos están en una concentración de al menos 500 nM.

De acuerdo con la presente invención, en la producción de péptidos cargados con MHC-I derivados de tumores o derivados de células de enfermedad de adenovirus recubiertos de polipéptido adaptados a pacientes se pueden aislar e identificar, sintetizar y mezclar sobre la cápside de un adenovirus oncolítico estimulante de DC. Sin embargo, el método comprende al menos dos etapas. En primer lugar, se identifican los polipéptidos más inmunogénicos cargados en MHC-I, y en segundo lugar, estos polipéptidos se cargan en la cápside de adenovirus oncolíticos.

### **Composiciones farmacéuticas**

La presente invención proporciona no solo métodos terapéuticos y usos para tratar trastornos sino también composiciones farmacéuticas para su uso en dichos métodos y usos terapéuticos. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden adenovirus recubiertos, solos o en combinación con otros agentes tales como un agente o agentes terapéuticamente eficaces y/o un vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo que consiste en un disolvente, diluyente, adyuvante, excipiente, tampón, portador, antiséptico, carga, agente estabilizante y agente espesante farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, se puede incluir cualquier otro componente que se encuentre normalmente en los productos correspondientes. En una realización de la invención, la composición farmacéutica comprende adenovirus recubiertos de polipéptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma, tal como forma sólida, semisólida o líquida, adecuada para la administración. Una formulación puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en, pero no se limita a, por ejemplo, soluciones, emulsiones o suspensiones. Los medios y los métodos para formular las presentes preparaciones farmacéuticas son conocidos por los expertos en la materia, y pueden fabricarse de una manera que sea conocida en sí misma.

### **Terapias**

Cualquier enfermedad o trastorno, que pueda tratarse, cuyo progreso pueda disminuir o donde se puedan mejorar los síntomas estimulando la respuesta inmunitaria específica del péptido contra las células anormales causadas por la enfermedad, se incluye dentro del alcance de la presente invención. En una realización de la invención, la respuesta

inmunitaria específica de péptido se selecciona de entre el grupo que consiste en respuesta inmunitaria anti-tumoral (contra tumores primarios y/o secundarios), anti-cáncer (contra neoplasias malignas primarias y/o secundarias), anti-infección y anti-virus. En estos casos, la respuesta inmunitaria se dirige contra un tumor (que incluye tumores tanto malignos como benignos, así como tumores primarios y secundarios), cáncer (es decir, neoplasia maligna primaria o secundaria), enfermedad infecciosa (por ejemplo, malaria), virus (en el caso de infección viral, por ejemplo, influenza, SARS-CoV o VIH) etc. en consecuencia. Por ejemplo, cualquier cáncer puede ser un objetivo del adenovirus recubierto de la presente invención. En una realización de la invención, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer nasofaríngeo, cáncer sinovial, cáncer hepatocelular, cáncer renal, cáncer de tejidos conectivos, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, cáncer cerebral, cáncer de garganta, cáncer de boca, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, coriocarcinoma, gastrinoma, feocromocitoma, prolactinoma, leucemia/linfoma de células T, neuroma, enfermedad de von Hippel-Lindau, síndrome de Zollinger-Ellison, cáncer adrenal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de uréter, cáncer de cerebro, oligodendroglioma, neuroblastoma, meningioma, tumor de la médula espinal, cáncer de hueso, osteocondroma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, cáncer de sitio primario desconocido, carcinoide, carcinoide del tracto gastrointestinal, fibrosarcoma, cáncer de mama, enfermedad de Paget, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de esófago, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de cabeza, cáncer de ojo, cáncer de cuello, cáncer de riñón, tumor de Wilm, cáncer de hígado, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de testículos, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, cáncer de boca, cáncer de piel, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer pancreático endocrino, glucagonoma, cáncer pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de pituitarias, sarcoma de tejidos blandos, retinoblastoma, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer trofoblástico, mola hidatiforme, cáncer de útero, cáncer endometrial, cáncer de vagina, cáncer de vulva, neurinoma del acústico, micosis fungoide, insulinooma, síndrome carcinoide, somatostatinooma, cáncer de encía, cáncer de corazón, cáncer de labio, cáncer de meninges, cáncer de boca, cáncer del sistema nervioso, cáncer del paladar, cáncer de la glándula parótida, cáncer de peritoneo, cáncer de faringe, cáncer de la pleura, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de lengua y cáncer de amígdala.

Como se usa en este documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a la administración de al menos vectores adenovirales recubiertos o una composición farmacéutica que comprende vectores adenovirales recubiertos a un sujeto. El término "tratar", así como las palabras derivadas del mismo, como se usan en este documento, no necesariamente implica un 100 % o un tratamiento completo o un aumento. Más bien, hay grados variables de los cuales un experto en la materia reconoce que tiene un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos y usos de la presente invención pueden proporcionar cualquier grado de tratamiento o prevención de una enfermedad. Por lo tanto, "tratar" incluye no solo la cura completa sino también, por ejemplo, la profilaxis, la mejora o el alivio de trastornos o síntomas relacionados con una enfermedad en cuestión, tal como cáncer, tumor, enfermedad infecciosa o infección viral. El efecto terapéutico puede evaluarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, por ejemplo, controlando los síntomas de un paciente o marcadores de enfermedad en la sangre.

Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un sujeto, que se selecciona de entre el grupo que consiste en un animal, un mamífero o un ser humano. En una realización de la invención, el sujeto es un ser humano o un animal.

El adenovirus recubierto con polipéptidos se administra a un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva, que causa la respuesta inmunitaria específica del péptido. Como se usa en este documento, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de adenovirus recubierto con la cual se mejoran, como mínimo, los efectos dañinos de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer). Los efectos dañinos incluyen cualquier efecto detectable o notable de un sujeto, tal como dolor, mareo o hinchazón.

Solo una administración de vectores adenovirales recubiertos o de una composición farmacéutica de la invención puede tener efectos terapéuticos. Por otro lado el tratamiento puede contener varias administraciones. Los vectores adenovirales o la composición farmacéutica se pueden administrar, por ejemplo, de 1 a 10 veces durante 2, 3, 4 u 8 semanas, o durante el período de tratamiento. La duración del período de tratamiento puede variar y, por ejemplo, puede durar de dos a 12 meses o más. En algunos casos, también es posible utilizar varios períodos de tratamiento para un paciente.

La dosis efectiva de vectores depende de al menos el sujeto que necesita el tratamiento, el tipo de enfermedad y la fase de la enfermedad. La dosis puede variar, por ejemplo, de aproximadamente  $1 \times 10^8$  partículas virales (PV) a aproximadamente  $1 \times 10^{14}$  PV, específicamente de aproximadamente  $1 \times 10^9$  PV a aproximadamente  $1 \times 10^{13}$  PV, y más específicamente, de aproximadamente  $5 \times 10^9$  PV a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  PV.

La administración del adenovirus recubierto se puede realizar mediante cualquier método adecuado conocido por un experto en la materia. En una realización de la invención, la administración de los vectores adenovirales se realiza a través de una inyección intratumoral, intra-arterial, intravenosa, intrapleural, intravesicular, intracavitaria o peritoneal, o una administración oral. También es posible combinar diferentes vías de administración.

5 Los adenovirus recubiertos también pueden usarse juntos (simultánea o secuencialmente) con otros agentes terapéuticos o métodos terapéuticos o una combinación de tratamientos. Por ejemplo, el método o uso de la invención puede comprender además radioterapia, quimioterapia, administración de otros fármacos o cualquier operación clínica.

10 Antes de clasificar a un paciente humano o animal como adecuado para la terapia de la presente invención, el médico puede examinar a un paciente. Basándose en los resultados que se desvían de lo normal y que ponen de manifiesto una enfermedad, tal como el cáncer, el médico puede sugerir los métodos o el tratamiento de la presente invención para un paciente.

#### 15 **Identificación de péptidos específicos para recubrimiento**

La presente invención pone de manifiesto un método para identificar al menos polipéptidos específicos de tumor y MHC-I de un sujeto. El método utiliza un estudio cualitativo y cuantitativo sobre el inmunopeptidoma MHC-I de tumores y DC expuestos al lisado tumoral, específicamente *in vitro*. La metodología en breve, resumida en la **Figura 5**, implica el aislamiento de moléculas MHC I de células tumorales y CD pulsadas con oncolisato *in vitro* (células tumorales infectadas por virus) y secuenciación de los polipéptidos asociados a MHC mediante tecnología basada en espectrometría de masas. Los péptidos inmunológicamente relevantes serán presentados por ambos, tumores y células dendríticas pulsadas con lisado tumoral. Por ejemplo, el uso del modelo de ratón que expresa OVA puede facilitar la validación del sistema, de hecho, los péptidos derivados de OVA inmunogénicos bien conocidos (por ejemplo, SIINFELK) resultan de los experimentos con ratones y pueden servir como control positivo.

Las células tumorales de un sujeto antes y después de la infección adenoviral *in vitro* se usan en el método con el fin de bloquear aquellos polipéptidos que se muestran por la célula debido a la infección viral. Las CD pulsadas con oncolisado tumoral *in vitro* también se usan en el método con el fin de permitir la presentación del antígeno tumoral. La ventaja de usar no solo el tumor sino también las DC pulsadas con el oncolisado tumoral para el aislamiento de péptidos específicos del tumor es la mejor identificación de los péptidos inmunológicos activos (solo si se presenta un péptido tanto en el tumor como en la DC, habrá una respuesta inmunitaria eficiente). El aislamiento de las moléculas MHC-I de las células tumorales y las células dendríticas se puede llevar a cabo mediante cualquier método de aislamiento adecuado de la técnica. Posteriormente, la secuenciación de los polipéptidos se puede llevar a cabo mediante cualquier tecnología adecuada basada en espectrometría de masas (por ejemplo, LC-MS/MS) para identificar los péptidos asociados a MHC. Los polipéptidos presentados tanto por tumores como por células dendríticas pueden identificarse comparando los polipéptidos presentados por estas células. Los polipéptidos comunes en dos grupos, es decir, los polipéptidos presentados por las DC pulsadas con lisado menos las DC no pulsadas (para eliminar los auto-péptidos de DC) y los polipéptidos presentados por tumores infectados con virus y tumores no infectados (para eliminar péptidos específicos del virus) son adecuados para recubrir los adenovirus. La comparación de polipéptidos se puede llevar a cabo manualmente o por cualquier método bioinformático conocido por un experto en la materia. Opcionalmente, la validación *in vitro*, *ex vivo* y/o *in vivo* se puede realizar para cualquier polipéptido específico o una combinación de los mismos. En una realización de la invención, además de aislar moléculas MHC-I de células tumorales infectadas y no infectadas así como células dendríticas infectadas, el método comprende además aislar moléculas MHC-I de células dendríticas no infectadas e identificar los polipéptidos asociados a MHC-I; e identificar aquellos polipéptidos que han sido presentados por los tumores infectados y no infectados de las etapas iii) y iv) y por las células dendríticas infectadas de la etapa iii) pero no por las células dendríticas no infectadas. En una realización específica de la invención, la infección de células tumorales y CD con vectores adenovirales tiene lugar *in vitro*. Los vectores adenovirales usados para el método de la presente invención pueden ser cualquier vector adenoviral, por ejemplo, cualquiera de estos vectores descritos en los capítulos anteriores.

En una realización de la invención, el método para identificar polipéptidos específicos de tumores y específicos de MHC-I de un sujeto se usa para seleccionar uno o más polipéptidos específicos de tumores y específicos de MHC-I para recubrir la cápsida adenoviral. Cualquiera de estos polipéptidos específicos de tumores y específicos de MHC-I o una combinación de los mismos puede usarse para el recubrimiento.

**EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos demuestran al menos el análisis del inmunopeptidoma MHC-I tumoral para aislar y seleccionar polipéptidos específicos del tumor, la generación y caracterización física de adenovirus oncolíticos recubiertos de polipéptidos específicos del tumor y la caracterización de los adenovirus recubiertos en modelos animales (por ejemplo, i) eficacia terapéutica, ii) capacidad para desviar la inmunidad antiviral a inmunidad antitumoral y iii) capacidad para reclutar células del sistema inmunitario y promover respuestas de células T).

**Preparación de adenovirus oncolíticos**

Todos los adenovirus oncolíticos (OAd) se generaron y propagaron usando protocolos convencionales, como se describió anteriormente (8). En resumen, los virus se amplificaron infectando 10 matraces T175 con 70-80 % de células A549 confluentes a una multiplicidad de infección (MOI) de 30. Tres días después de la infección, las células se recogieron y se lisaron a través de cuatro ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación (37 °C). Las partículas adenovirales se separaron luego de los residuos celulares y las impurezas mediante dos ultra-centrifugadoras (22.000 y 27.000 rpm) en gradientes de CsCl. Las bandas recuperadas se purificaron mediante diálisis durante una noche a 4 °C frente a tampón A195 con agitación continua. Específicamente, se usaron casetes de diálisis con un corte de peso molecular de 10.000 kDa (Pierce, Life Technologies). Los virus purificados se recuperaron de los casetes, se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

La integridad del genoma adenoviral se evaluó mediante PCR usando cebadores específicos para el gen E3 y la eliminación de D24 en el gen E1A.

El título de partículas virales se determinó usando el método espectrofotométrico, mientras que el título infeccioso se determinó mediante tinción inmunocitoquímica, como se describe en otra parte de esta sección. La concentración de proteína de la preparación viral se determinó mediante el ensayo de Bradford usando un concentrado de reactivo de tinte de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Todas las lecturas espectrofotométricas se realizaron con un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenber, Alemania).

Todos los virus usados en este estudio han sido informados previamente: Ad5D24 es un adenovirus que presenta una eliminación de 24 pares de bases (D24) en el gen E1A (9), Ad5D24-CpG es un OAd que tiene un genoma enriquecido con CpG en el gen E3 (30), y Ad5D24-GM-CSF es un OAd que expresa GM-CSF bajo el control del promotor viral E3 (8).

**Análisis del inmunopeptidoma MHC-I para aislar y seleccionar péptidos específicos de tumores****Método 1a:**

Se recogieron células dendríticas de médula ósea de CD11c+ de ratón de ratones C57BL/6 y se cultivaron durante 1 semana<sup>23</sup>. Las células fueron expuestas a:

A) PBS como control,

B) Oncolisado de células B16-OVA (el oncolisado proviene de células B16-OVA infectadas con el adenovirus oncolítico Ad5D24 hasta su lisis completa),

C) Lisado de células B16-OVA obtenido por congelación y descongelación de las células.

En diferentes puntos de tiempo, el MHC-I cargado con péptidos se aisló a partir de DC viables usando una elución de ácido suave<sup>25</sup>. En el momento del análisis, los péptidos se disolvieron en solución acuosa y se analizaron por nano LC-MS/MS en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific). Las búsquedas en la base de datos se realizaron contra la versión 3.23 de la base de datos de ratón del índice de proteínas internacional que contiene 51536 secuencias y 24497860 residuos, <http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhelp.html>). Los péptidos relevantes estaban en el grupo formado por los péptidos que están comúnmente presentes en ambos grupos, DC pulsada con lisado menos DC no pulsada (para eliminar auto péptidos de DC) y B16-OVA infectados por el virus menos B16-OVA no infectados (para eliminar péptidos específicos del virus).

**Método 1b:**

Primero redujimos la complejidad del inmunopeptidoma del método 1a *in silico*. Predicción de péptidos de clase MHC-I (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>). Se usaron anotaciones funcionales de las proteínas (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) y (<http://www.ingenuity.com>).

Se usó el análisis oncomine (<https://www.oncomine.org>) para sugerir el nivel de expresión de una proteína dada en diferentes cánceres humanos y líneas celulares. Lo más importante es que validamos nuestros péptidos utilizando un predictor de herramienta de epítipo ([17]).

5 Experimentalmente, para seleccionar los péptidos más inmunogénicos, usamos un ELISPOT de IFN-gamma de ratón (Mabtech AB, Suecia) en esplenocitos, tumores y ganglios linfáticos extraídos de ratones C57BL/6 y pulsados con todos los diferentes péptidos aislados del método 1a.

10 En resumen, los ratones C57BL/6 con tumores B16-OVA se trataron con adenovirus oncolíticos (Ad5D24). Una o dos semanas después del tratamiento, los ratones se sacrificaron y los órganos y tumores se recogieron y se redujeron a una suspensión de células individuales para el análisis ELISPOT de IFN-gamma (Mabtech, Palo Alto CA). Posteriormente, una vez que identificamos un grupo de algunos de los péptidos más inmunogénicos, generamos un tetrámero personalizado o pentámero (Proimmune, Reino Unido) para la detección basada en el citómetro de flujo de  
15 células T CD8 específicas que reconocen estos péptidos en moléculas MHC-I.

### ***Generación y caracterización física de adenovirus oncolíticos recubiertos de péptidos específicos de tumores***

Debido a que los péptidos derivados de OVA son muy conocidos, como prueba de concepto primero generamos un  
20 virus recubierto específico de OVA (**Figura 6**). Más específicamente, generamos un adenovirus recubierto con SIINFEKL (SIINFEKL (SEQ ID NO:1) es el péptido derivado de OVA más inmunogénico); un virus recubierto con SIINFEDL (SIINFEDL (SEQ ID NO:7) es un antagonista del péptido SIINFEKL); un virus recubierto con FILKSINE (FILKSINE (SEQ ID NO:3) es un péptido aleatorio de SIINFEKL).

#### **Método 2a:**

Con el fin de generar un adenovirus oncolítico recubierto de péptido se tomaron en cuenta diferentes estrategias (**Figura 7**).

30 Uno usará la unión electrostática entre el virus y los péptidos y otros dos involucrarán enlaces covalentes entre el virus y los péptidos.

I. Interacción electrostática. Péptidos cargados positivamente en complejo con cápside negativa del virus<sup>26</sup>.

II. Enlace covalente. Enlace disulfuro con la cisteína de la proteína de la cápside<sup>27,28</sup>.

35 III. Enlace covalente. Enlace amídico. Reacción del éster succinimidílico con grupos amina de lisina de la cápside<sup>28</sup>.

Los métodos de enlace se describen en los documentos de bibliografía correspondientes.

En una realización de la invención, se prepararon adenovirus oncolíticos recubiertos con péptido de la manera siguiente:

#### **40 Formación de complejos de PeptiCRAd**

Todos los complejos de PeptiCRAd descritos en este trabajo se prepararon mezclando virus oncolíticos (como se describe en el título "Preparación de adenovirus oncolíticos") y poliK-epítomos en una relación de 1:500 (véase las  
45 **Figuras 8A y 12**) de acuerdo con el siguiente protocolo: i) para cada microlitro de preparación viral usada, se calculó el número correspondiente de microgramos de proteína presente; ii) luego, por cada microgramo de proteína viral, se añadieron 500 µg de péptido; iii) después de agitar con formación de vórtice, la mezcla se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 15 minutos; y iv) la solución se agitó con formación de vórtice y se usó para ensayos o inyecciones en animales. Se prepararon nuevos PeptiCRAds antes de cada experimento usando reactivos frescos.

50 Todas las diluciones de virus y péptidos requeridas antes de la incubación se realizaron en agua Milli-Q estéril ajustada a pH 7,4. Los PeptiCRAds se diluyeron luego con el tampón requerido por el ensayo.

#### **Método 2b:**

55 La infectividad de este virus recubierto de péptido del método 2a se evaluó in vitro mediante el ensayo de luciferasa y mediante qPCR en diferentes líneas celulares (humanas y murinas)<sup>30</sup>. Para evaluar la infectividad, se infectó un panel de diferentes líneas celulares tumorales con diferentes niveles de expresión de CAR con diferentes concentraciones de virus recubierto que expresa luciferasa (Ad5D24-Luc) (1, 10, 100, 1000 PV/célula); El virus no recubierto siempre se usó como control. En diferentes puntos de tiempo se cuantificó la expresión de luciferasa. Simultáneamente, se

recogió el ADN total y se cuantificó la replicación del ADN viral mediante qPCR. La actividad oncolítica *in vitro* se analizó mediante los ensayos TCID50 y MTS<sup>31</sup>.

En una realización de la invención, la infectividad fue estudiada por ICC de la manera siguiente:

5

#### **Ensayo de infectividad por ICC**

Las células tumorales se sembraron a  $2,0 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 24 pocillos en 3 o 5 réplicas. Al día siguiente, las células se infectaron con 100  $\mu$ l de diluciones virales. Las placas se centrifugaron luego durante 90 minutos a 1.000 rcf a 37 °C, seguido de incubación durante 48 horas. Después del período de incubación, los medios de cultivo se eliminaron y las células se fijaron mediante incubación con 250  $\mu$ l de metanol helado durante 15 minutos. Una vez que se eliminó el metanol, las células se lavaron 3 veces con 300  $\mu$ l de PBS complementado con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA). A continuación, las células se tiñeron con 250  $\mu$ l de anticuerpo anti-hexón monoclonal de ratón (Novus Biologicals, Littleton, CO, EE. UU.), se diluyeron 1:2.000, durante 1 hora a TA en la oscuridad. Luego, las células se lavaron y se tiñeron con 250  $\mu$ l de anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con biotina-estreptavidina, diluido 1:500 con PBS/BSA al 1 %, durante 1 hora a TA en la oscuridad. Las células se incubaron posteriormente con 250  $\mu$ l de extravidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), se diluyeron 1:200, durante 30 minutos a TA. Las células se lavaron exhaustivamente y se preparó una solución de tinción DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego se aplicó un total de 250  $\mu$ l de solución de tinción DAB a cada pocillo y las células se controlaron bajo un microscopio para detectar la aparición de manchas oscuras. Cuando se alcanzó la relación óptima de señal a ruido, la reacción se interrumpió mediante la adición de PBS/BSA al 1 % (500  $\mu$ l por pocillo). Para cada réplica (es decir, pocillo), se adquirieron 5 imágenes de campos no superpuestos usando un microscopio AMG EVOS XL (grupo AMG, Life Technologies). Se usó la siguiente fórmula para determinar el título infeccioso:

25

$$\text{Título de la infección} = x * \frac{\text{área del pocillo}}{\text{área del campo}} * \frac{1}{\text{factor de dilución}} * \frac{1 \text{ ml}}{\text{volumen de dilución aplicado}}$$

Para las comparaciones de infectividad, los datos se presentan como el número medio de manchas en cada campo.

#### **En apoyo de los métodos 2:**

30

La cápside de adenovirus cargada negativamente se recubrió electrostáticamente con péptido específico del tumor. Este complejo tenía una variación en el potencial Z que es proporcional a la cantidad de péptidos. Este cambio del potencial Z mostró que los péptidos cargados positivamente se unían a la cápside viral y determinaban la inversión de la carga (línea de puntos de la **Figura 8A**). Una vez que todas las cargas negativas de la cápside se habían saturado, el potencial Z parecía enriquecerse en un nivel estable (línea de círculos de la **Figura 12**). Se puede formar un complejo monodispersado uniforme con una concentración de polipéptidos de más de 500 nM para que transcurra a la eficacia *in vitro* e *in vivo*.

35

Para caracterizar aún más el complejo de adenovirus recubierto de péptido, realizamos varios ensayos de viabilidad (ensayo MTS) comparando la eficacia de la destrucción celular de PeptiCRAAd con virus oncolíticos no recubiertos (**Figura 9**). Los resultados indican que el recubrimiento del virus produce constantemente una actividad de destrucción celular sin alterar o mejor en comparación con los virus oncolíticos no recubiertos.

40

En una realización de la invención, el ensayo de viabilidad se llevó a cabo de la manera siguiente:

45

#### **Ensayo de viabilidad**

Las células tumorales se sembraron a  $1,0 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 96 pocillos en medios de crecimiento con FBS al 5 %. Al día siguiente, se eliminaron los medios y se usaron 50  $\mu$ l de virus, diluidos en medios de crecimiento con FBS al 2 %, para infectar las células durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de medio de crecimiento con FBS al 5 % y las células se incubaron nuevamente a 37 °C. Los medios de crecimiento se cambiaron cada dos días. Cuando las condiciones más infecciosas (100 pv/célula) mostraron un exhaustivo efecto citopático (> 90 %), la viabilidad celular se determinó mediante un ensayo MTS de acuerdo con el protocolo del fabricante (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Nacack, Suecia). Los datos espectrofotométricos se adquirieron con Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EE. UU.).

50

55

#### **Diseño del estudio**

El tamaño de la muestra se determinó usando la siguiente ecuación:

$$n = 1 + 2C \left( \frac{s}{d} \right)^2$$

5 donde C es una constante basada en los valores  $\alpha$  y  $\beta$ , s es la variabilidad estimada y d es el efecto a observar (34). Para todos los experimentos con animales, se consideró una energía (1- $\beta$ ) de al menos el 80 % y una significación ( $\alpha$ ) de 0,05. Las reglas para detener la recopilación de datos fueron i) la muerte de más del 60 % de los ratones en uno o más grupos y ii) la eliminación total de los tumores. Todos los ratones que murieron antes del final del experimento se  
10 excluyeron de las curvas de crecimiento para preservar la integridad estadística del análisis.

El objetivo de la investigación fue usar modelos de melanoma para probar si los OAd podrían representar un adyuvante válido para un enfoque de vacuna contra el cáncer de péptidos. Además, se plantearon dos preguntas específicas: i) ¿Puede PeptiCRAAd limitar el crecimiento de tumores distantes sin tratar? ii) ¿Se puede mejorar la eficacia de  
15 PeptiCRAAd al atacar múltiples antígenos tumorales en lugar de uno solo? Para responder a estas preguntas, utilizamos ratones inmunocompetentes o humanizados con tumores de melanoma. Los ratones se asignaron al azar a cada grupo experimental y no se adoptó el ocultamiento.

#### **Líneas celulares, reactivos y muestras humanas**

20 La línea celular de carcinoma de pulmón humano A549, la línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano CACO-2, la línea celular de melanoma maligno humano SK-MEL-2, la línea celular de melanoma humano HS294T y la línea celular de melanoma de ratón B16-F10 se compraron en American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, EE. UU.). La línea celular B16-OVA (35), una línea celular de melanoma de ratón que expresa OVA de pollo, fue  
25 amablemente proporcionada por el Prof. Richard Vile (Clínica Mayo, Rochester, MN, EE.UU.).

Las líneas celulares A549, CACO-2 y B16-OVA se cultivaron en DMEM con bajo contenido de glucosa (Lonza, Basilea, Suiza), la línea celular HS294T se cultivó en DMEM con alto contenido de glucosa (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), la línea celular SK-MEL-2 se cultivó en EMEM (ATCC) y la línea celular B16-F10 se cultivó en RPMI-  
30 1640 (Gibco, Life Technologies). Todos los medios se complementaron con suero fetal bovino al 10 % (FBS; Gibco, Life Technologies), GlutaMAX 2 mM (Gibco, Life Technologies) y 100 U/ml de penicilina y 0,1 mg/ml de estreptomycin (Gibco, Life Technologies). La línea celular B16-OVA también se cultivó en presencia de 5 mg/ml de geneticina (Gibco, Life Technologies) para asegurar la selección de células que expresan OVA. Durante el período de cultivo o cuando  
35 sea necesario para ensayos, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1 vez y se separaron por incubación con TrypLE Express (Gibco, Life Technologies) 1 vez durante 3 minutos a 37 °C.

Los péptidos SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>), poliK-SIINFEKL, SIINFEKL-poliK, poliK-AHX-SIINFEKL, poliK-SVYDFVWL (TRP-2<sub>180-188</sub>), poliK-KVPRNQDWL (hgp100<sub>25-33</sub>) y poliK-SLFRAVITK (MAGE-A1<sub>96-104</sub>) se compraron en Zhejiang  
40 Ontores Biotechnologies Co. (Zhejiang, China). La pureza de todos los péptidos se estimó en >80 %, y se analizaron mediante análisis espectral de masas.

En el capítulo de ejemplos, poliK se refiere a 6K.

La carga neta de péptidos se calculó mediante la calculadora de propiedades de péptidos Véase 3.1 herramienta en  
45 línea (<http://www.biosyn.com/PeptidePropertyCalculator/PeptidePropertyCalculator.aspx>).

El genotipo de la línea celular SK-MEL-2 fue HLA-A\*03-\*26; B \*35-\*38; C\* 04-\*12. La capa Buffy de un donante sano también se obtuvo del servicio de la Cruz Roja Finlandesa, y el genotipo se determinó como HLA-A\*03-\*03; B\*07-\*27; C \*01-\*07

50

#### **Caracterización de adenovirus recubiertos en modelos animales**

##### **Método 3a:**

55 Probamos *in vivo* la eficacia, la inmunogenicidad, la toxicidad, la biodistribución de los virus recubiertos frente a los virus oncolíticos regulares no recubiertos. La eficacia y la inmunogenicidad se probaron en ratones C57BL/6 con tumores B16-OVA. El virus recubierto con SIINFEKL presentó una respuesta anti-OVA más robusta que se tradujo en un control del tumor más prominente (eficacia), en comparación con otros virus recubiertos (antagonista, aleatorio y no recubierto). Simultáneamente, a través de la transferencia adaptativa de células radiomarcadas (CD y células T),

también se evaluó el tráfico de estas células al microentorno del tumor. Finalmente, también se estudió la toxicidad y la biodistribución del vector adenoviral modificado.

Para estudiar la eficacia de los virus recubiertos, se trataron diferentes grupos de ratones C57BL/6 (N = 15 por grupo) con tumores B16-OVA singénicos (dos tumores por ratón) de la manera siguiente: a) virus recubierto con SIINFEKL b) virus recubierto con SIINFEDL c) virus recubierto con FILKSINE y d) virus no recubierto como control. En diferentes puntos de tiempo a partir de los 3 días posteriores a la administración del virus, se sacrificaron dos ratones por grupo y se recogieron el bazo, los ganglios linfáticos y el tumor en una suspensión de células individuales para ELISPOT, co-cultivo y análisis de citometría de flujo. Simultáneamente, el crecimiento del tumor se midió con un calibrador convencional a lo largo del tiempo. El análisis de citometría de flujo puso de manifiesto directamente la cantidad de células T específicas de SIINFEKL en el tumor, en el bazo y en los ganglios linfáticos (con y sin drenaje del tumor). Para este análisis usamos pentámeros específicos de SIINFEKL (por ejemplo, 31). El ELISPOT de IFN-gamma de ratón también nos proporcionó una indicación cuantitativa de la activación de las células T anti-OVA (anti-SIINFEKL). En el experimento de co-cultivo probamos *in vitro* la capacidad de las células T (recogidas de ratones experimentales) para matar B16 y B16-OVA. Las células se cultivaron conjuntamente en diferentes relaciones célula:objetivo y se evaluó la viabilidad de B16 y B16-OVA mediante el ensayo MTS o MTT. En todo este experimento se usaron células T recogidas de ratones OT-I como control. También se usó el modelo CMT64-OVA, que es un tumor murino que expresa OVA donde el adenovirus humano es semipermisivo<sup>33</sup>.

#### 20 **Método 3b:**

Se comparó la actividad anti-tumoral e inmunogenicidad de un virus recubierto con: i) péptido OVA (SIINFEKL (SEQ ID NO:1)), ii) péptido B16 TRP2 (SVYDFFVWL (SEQ ID NO:5)), iii) péptido hgp100 (KVPRNQDWL (SEQ ID NO:6)) o iv) nuevos péptidos identificados en el método 1.

Estos virus fueron probados por su eficacia y capacidad para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral. La respuesta antiviral se comparó con la respuesta antitumoral (análisis ELISPOT y pentámero). También se evaluó la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria a un epítipo diferente (por ejemplo, el virus OVA desencadena una respuesta TRP2, la propagación del epítipo). Los métodos usados en este método ya se han descrito en el método 3a.

#### **Estudios basados en los métodos 2 y 3:**

Generamos un PeptiCRAd específico de OVA (adenovirus oncolíticos recubiertos con SIINFEKL) como se describe en la estrategia I de la **Figura 7**. En resumen, los péptidos sintéticos SIINFEKL se sintetizaron y se unieron a un enlazador de poli-lisina (poliK-SIINFEKL) para conferir a los péptidos una carga neta positiva y formaron complejos con virus desnudos que tienen una carga neta negativa, 30 minutos antes de la inyección. El complejo se administró luego por vía intratumoral a ratones con tumores B16-OVA subcutáneos. Se controló el crecimiento del tumor y, al final del experimento, se sacrificaron los ratones, se recogieron los tumores y se cuantificaron las células T específicas de OVA mediante citometría de flujo (**Figura 10**).

Este experimento demuestra la superioridad del vector adenoviral modificado de la presente invención en comparación con el virus solo y con el virus y los péptidos administrados por separado. También muestra la importancia de la correcta formulación del virus recubierto, ya que con concentraciones más altas de péptidos parece inducir menos células T específicas de tumores (datos no mostrados).

#### **Adenovirus recubiertos de segunda generación**

##### **Método 4:**

Los PeptiCRAd de segunda generación se generaron mediante el recubrimiento de virus oncolíticos con más de un solo péptido para provocar una respuesta inmunitaria más robusta y polivalente. Estos nuevos virus se caracterizaron como en el método 2 y la eficacia se evaluó como se describe en el método 3. Posteriormente, recubrimos un adenovirus oncolítico armado con citoquinas con varios tipos de polipéptidos. Los polipéptidos pueden ser diferentes péptidos específicos de MHC-I del mismo antígeno, o péptidos de MHC-I de diferentes antígenos, o una combinación de péptidos restringidos por MHC-I y MHC-II.

#### **Métodos usados para analizar los virus oncolíticos recubiertos**

### Análisis del potencial Z y la dispersión dinámica de la luz (DLS)

Las muestras de virus oncolíticos recubiertos se prepararon como se describe en el título "Formación de complejos de PeptiCRAAd". Cada muestra se agitó con formación de vórtice y se diluyó hasta un volumen final de 700 µl con agua Milli-Q estéril ajustada a pH 7,4, después de lo cual la muestra se transfirió a una cubeta desechable de poliestireno para determinar el tamaño de los complejos. La muestra se recuperó luego de la cubeta y se transfirió a una célula capilar desechable DTS1070 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) para las mediciones del potencial zeta. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C con un Zetasizer Nano ZS (Malvern).

### 10 SPR

La interacción de poliK-SIINFEKL o SIINFEKL con OAd se evaluó usando SPR. Las mediciones se realizaron con un instrumento multiparamétrico SPR Navi™ 220A (Bionavis Ltd, Tampere, Finlandia). Este instrumento comprende un canal de flujo doble con control de temperatura con un sistema de fluidos integrado y un muestreador automático para el manejo de la muestra y el tampón. El agua Milli-Q con su pH ajustado a 7,4 se usó como un tampón de funcionamiento. Además, se usó un caudal constante de 30 µl/min a lo largo de los experimentos, y la temperatura se ajustó a + 20 °C. La luz láser con una longitud de onda de 670 nm se usó para la excitación de plasmones de superficie.

Antes del experimento SPR, se activó un portaobjetos con una superficie de dióxido de silicio durante 3 minutos de tratamiento con plasma seguido de un recubrimiento con APTES ((3-aminopropil)triethoxisilano) incubando el sensor en APTES 50 mM en solución de tolueno durante 1 hora. El sensor se colocó luego en el dispositivo SPR y los OAd se inmovilizaron *in situ* en la superficie del sensor del canal de prueba inyectando 50 µg/ml de OAd en agua Milli-Q (pH 7,4) durante aproximadamente 12 minutos, seguido de un lavado de 3 minutos con CHAPS 20 mM (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato). El segundo canal de flujo se usó como referencia y se inyectó con agua Milli-Q (pH 7,4), seguido de lavado con CHAPS. El valor inicial se observó durante al menos 10 minutos antes de las inyecciones de muestra. PoliK-SIINFEKL o SIINFEKL se inyectaron luego en ambos canales de flujo de la celda de flujo en paralelo, con concentraciones crecientes.

### Experimento de presentación cruzada

Se recogieron bazo frescos de ratones C57BL/6 sin tratamiento previo y se forzaron a través de un tamiz de células de 70 µm (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los glóbulos rojos se lisaron incubando las muestras con 5 ml de tampón de lisis ACK (Life Technologies) durante 5 minutos a TA. Posteriormente, los esplenocitos se lavaron y se prepararon para el ensayo ( $2 \times 10^6$  células en 800 µl de medio de cultivo RPMI-1640 al 10 % para cada condición probada). Se añadieron a los esplenocitos un total de 200 µl de dilución de péptido SIINFEKL, poliK-SIINFEKL, SIINFEKL-poliK o SIINFEKL-AHX-poliK (0,19 µg/µl). Para probar OVA-PeptiCRAAd, se usó una condición infecciosa de 100 pv/célula (un total de  $7,9 \times 10^9$  pv mezclado con 37,5 µg de poliK-SIINFEKL en 200 µl de RPMI-1640 al 10 %). El complejo de PeptiCRAAd se preparó como se describe en el método 2. Los esplenocitos se incubaron luego durante 2 horas a 37 °C. Después, las células se lavaron exhaustivamente y se tiñeron con APC anti-ratón H-2K<sup>b</sup> unido a SIINFEKL o APC de ratón IgG1, control de isotipo kappa (BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.). Después de una incubación de 30 minutos en hielo, las muestras se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo.

### Análisis de citometría de flujo

Los tumores, los bazo y los ganglios linfáticos de los ratones tratados se recogieron, se forzaron a través de un tamiz de células de 70 µm y se cultivaron durante una noche en medio RPMI-1640 al 10 %. Cuando fue necesario, las muestras se congelaron en RPMI-1640 (con FBS al 10 % y DMSO al 10 %) y se almacenaron a -80 °C. Las suspensiones de células individuales se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo y se analizaron usando un citómetro de flujo BD LSR II (BD Biosciences) o Gallios (Beckman Coulter) y el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EE. UU.). Se usó PBS estéril como tampón de tinción. Las células T específicas de epítipo se estudiaron usando pentámeros MHC de clase I (Prolimmune, Oxford, Reino Unido). Otros anticuerpos usados incluyeron los siguientes: Fc CD16/32 de bloqueo murino y humano (BD Pharmingen); FITC anti-ratón CD8 y FITC anti-humana CD8 (Prolimmune); PE/Cy7 anti-ratón CD3ε, PE/Cy7 anti-ratón CD19, FITC anti-ratón CD8 y FITC anti-humana CD8 (Prolimmune); PE/Cy7 anti-ratón CD3ε, PE/Cy7 anti-ratón CD19, FITC anti-ratón CD11c, PerCp/Cy5.5 anti-ratón CD86, APC anti-ratón H-2K<sup>b</sup> unido a SIINFEKL y APC de ratón IgG1, control de isotipo κ (BioLegend). Todos los procedimientos de tinción se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

### Análisis estadístico

La significación estadística se determinó utilizando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Se puede encontrar una descripción detallada de los métodos estadísticos usados para analizar los datos de cada experimento en cada breve descripción del dibujo.

## 5 Experimentos con animales y cuestiones éticas

Los experimentos con animales se hicieron bajo la ley y legislación finlandesa y europea. El permiso para animales (ESAVI/5924/04.10.03/2012) ha sido revisado y aceptado por las autoridades finlandesas (el comité de animales experimentales de la universidad de Helsinki y el gobierno provincial del sur de Finlandia). Se obtuvieron ratones C57BL/6 completamente inmunocompetentes de Scanbur (Karlsunde, Dinamarca), y ratones NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>-IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ con triple eliminación inmunodeficientes de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EE.UU.). Todos los ratones se compraron a las 4-6 semanas de edad y se pusieron en cuarentena durante 2 semanas antes del estudio. Los ratones se mantuvieron en jaulas con flujo de aire aislado y controlado, y tuvieron acceso ilimitado a los alimentos durante todo el período de estudio. El estado de salud de los ratones se controló con frecuencia y los animales se sacrificaron a los primeros signos de dolor o malestar. Todos los procedimientos se realizaron en un gabinete de bioseguridad de nivel 2 en condiciones estériles.

Para los experimentos de eficacia, las células tumorales se recogieron en una confluencia del 60 al 70 % (fase logarítmica de crecimiento) y se inyectaron por vía subcutánea (sc) en los flancos de los ratones. El número de células tumorales inyectadas en cada flanco varió de acuerdo con el tipo de línea celular:  $3 \times 10^5$  B16-OVA,  $1 \times 10^5$  B16-F10 y  $2 \times 10^6$  SK-MEL-2. En todos los experimentos, se administraron tres inyecciones de tratamiento. Luego se siguió el crecimiento del tumor y se determinó el volumen del tumor usando la fórmula.

De acuerdo con nuestra licencia, los criterios de valoración humanos fueron los siguientes: i) pérdida de peso del 25 %, ii) un diámetro del tumor > 15 mm, y iii) signos evidentes de dolor (movilidad reducida o ulceración del tumor). La eutanasia se realizó por inhalación de dióxido de carbono seguido de dislocación cervical.

## Resultados

*La carga negativa de la cápside de adenovirus se puede usar para formar complejos de péptidos inmunogénicos cargados positivamente, formando PeptiCRAAd.*

Las cápsides de adenovirus tienen una carga neta altamente negativa (36); por lo tanto, planteamos la hipótesis de que un péptido restringido por MHC-I cargado positivamente se uniría a la cápside por interacción electrostática, cubriendo el virus con péptidos inmunológicamente relevantes (es decir, péptidos restringidos por MHC-I específicos de tumores). Para probar nuestra hipótesis, usamos el modelo de tumor B16-OVA (37). Esta línea celular expresa ovalbúmina de pollo (OVA) y presenta el péptido SIINFEKL derivado de OVA, que usamos como epítipo modelo, en MHC-I.

Para permitir la interacción electrostática entre el péptido neutro e hidrófobo SIINFEKL y la superficie viral negativa, añadimos una cadena de polilisina (poliK) a la secuencia peptídica. Esta modificación química aumentó la carga neta del péptido de 0 a +6 mV en condiciones fisiológicas. A continuación, investigamos la interacción entre la cápside viral y los péptidos modificados por resonancia de plasmón de superficie (SPR). En particular, recubrimos un sensor APTES de sílice SiO<sub>2</sub> con Oad e inyectamos concentraciones crecientes de SIINFEKL o poliK-SIIN en el sistema de flujo (Figura 8B). No se observó ningún aumento en la señal con el péptido no modificado (Figura 8B, línea discontinua), mientras que se observó un aumento dependiente de la concentración en la señal con el péptido modificado (Figura 8B, línea continua), lo que demuestra que la modificación del péptido aumentó significativamente la interacción con la cápside del adenovirus.

Luego, investigamos la concentración óptima de péptido requerida para cubrir eficientemente la superficie del virus. Con este fin, evaluamos la carga neta y el diámetro hidrodinámico de los complejos virus-péptido resultantes de diferentes relaciones OAd:péptido (1:5, 1:50, 1:100 y 1:500). Observamos una clara relación entre la cantidad de péptido positivo en la reacción y la carga neta de los complejos (Figura 8A). La relación más baja (1:5) fue capaz de aumentar la carga de las partículas virales de  $-29,7 \pm 0,5$  a  $+6,3 \pm 0,06$  mV, aunque en estas condiciones se observó una gran agregación, como lo indica un aumento en el tamaño de los complejos ( $800 \pm 13,5$  nm). Por encima de 1:5, la carga neta aumentó, alcanzando una cinética de niveles estables; de hecho, medimos potenciales zeta de  $+17,5 \pm 0,2$ ,  $+18,4 \pm 0,1$  y  $+18 \pm 0,8$  mV para las relaciones 1:50, 1:100 y 1:500, respectivamente. Sin embargo, solo en una relación de 1:500 el diámetro del complejo disminuyó por debajo de 120 nm, lo que representa el diámetro normal de las partículas adenovirales. (Figura 8A) El mismo experimento también se ha repetido con la concentración de los péptidos y no con la relación para facilitar la repetibilidad (Figura 12).

*Los epítomos MHC-I modificados adsorbidos en PeptiCRAd se presentan de manera eficiente en forma cruzada.*

Para inducir una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T citotóxicos, los péptidos deben presentarse de forma cruzada a linfocitos T CD8<sup>+</sup> sin tratamiento previo a través de MHC-I en las APC. Por lo tanto, investigamos si la presencia y la posición de la cadena poliK podrían afectar la eficiencia de la presentación cruzada. Para ello, pulsamos esplenocitos cultivados *ex vivo* (de ratones C57BL/6) con SIINFEKL natural o dos versiones diferentes de lisina extendida: poliK-SIINFEKL (extremo extendido en N) y SIINFEKL-poliK (extremo extendido en C). Como control negativo, incluimos SIINFEKL extendido que contiene un residuo amino caproico (AHX), que es un análogo bien conocido de la lisina que puede inhibir la actividad proteolítica del proteasoma. A continuación, evaluamos la presentación cruzada de SIINFEKL con el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente el MHC-I cargado con SIINFEKL (38).

Como se esperaba, el 98,5 % de los esplenocitos pulsados con SIINFEKL fueron positivos para la presencia de SIINFEKL en la molécula de MHC-I en las membranas de esplenocitos (**Figura 13A**). Curiosamente, la posición de la cadena poliK en la secuencia del péptido cambió significativamente la proporción de células teñidas. De hecho, el 94,5 % de los esplenocitos pulsados con el péptido extendido en el extremo N presentaron en cruzado SIINFEKL. Por el contrario, cuando los esplenocitos se pulsaron con el SIINFEKL-poliK extendido en el extremo C, la población teñida disminuyó a 27,1 %. Cuando se pulsó con el control negativo SIINFEKL-AHX-poliK, solo el 1,36 % de los esplenocitos presentaron en cruzado el péptido SIINFEKL. Basándose en estos hallazgos, elegimos la versión extendida en el extremo N (poliK-SIINFEKL) para estudios adicionales.

A continuación, investigamos si la adsorción del SIINFEKL modificado en la cápside viral podría afectar su presentación cruzada. Como en el experimento anterior, incubamos esplenocitos de ratón con el péptido SIINFEKL o poliK-SIINFEKL o con OVA-PeptiCRAd. Descubrimos que el poliK-SIINFEKL extendido en el extremo N en complejo con un OAd, formando PeptiCRAd, permitió una presentación eficiente restringida por MHC-I del péptido SIINFEKL (**Figura 13B**).

***PeptiCRAd muestra una infectividad inalterada y una actividad oncolítica intacta en comparación con los virus no modificados.***

Los OAd pueden infectar selectivamente las células tumorales y lisarlas a través del ciclo de replicación de OAd. Por lo tanto, investigamos si el recubrimiento de los virus con péptidos modificados afectaría sus propiedades biológicas. Elegimos estudiar una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano (CACO-2) que exprese niveles bajos de receptor de coxsackie y adenovirus (CAR) y dos líneas celulares de melanoma humano (SK-MEL-2 y A2058) que expresen niveles más altos de CAR. Se realizó por primera vez un ensayo de viabilidad *in vitro* que compara OVA-PeptiCRAd con el virus no modificado Ad5D24 (**Figura 14A**), y los resultados no mostraron diferencias significativas con respecto a la actividad oncolítica. Como se esperaba, la condición más infecciosa (100 pv/célula) se correlacionó con la viabilidad más baja en todas las líneas celulares. Además, demostramos que el péptido poliK-SIINFEKL no tenía ningún efecto tóxico en las células.

A continuación, evaluamos la infectividad de PeptiCRAd mediante ensayos de inmunocitoquímica (ICC) usando las mismas líneas celulares *in vitro* (**Figura 14B**). Si bien no observamos ninguna diferencia en la línea celular SK-MEL-2, en las líneas celulares CACO-2 y A2058, el PeptiCRAd mostró un aumento significativo ( $P < 0,01$ ) en la infectividad en comparación con el adenovirus desnudo. Este aumento fue probablemente debido a las diferentes cargas de PeptiCRAd y el adenovirus desnudo (36).

***Estudios de la eficacia antitumoral y la inmunología de una vacuna contra el cáncer PeptiCRAd en un modelo murino de melanoma.***

Para estudiar a fondo la eficacia antitumoral de PeptiCRAd y la inmunidad antitumoral que promueve, primero usamos un modelo murino de melanoma que sobreexpresa OVA de pollo (B16-OVA) (35). Específicamente, se implantó B16-OVA en los flancos de los ratones, después de lo cual se trataron los tumores establecidos. El experimento se realizó usando un OAd que contenía la eliminación de D24 en E1A (Ad5D24) (37) y luego se repitió con un adenovirus rico en CpG (Ad5D24-CpG) (39) para reforzar aún más la inmunidad (**Figura 15**). Los grupos de estudio incluyeron ratones tratados con OVA-PeptiCRAd, con Ad5D24-CpG no en forma de complejo y SIINFEKL (Ad5D24-CpG + SIINFEKL), con OAd (Ad5D24-CpG) o péptido (SIINFEKL) solo o con solución salina (simulado).

El tratamiento con PeptiCRAd redujo significativamente el crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento simulado o la mezcla de OAd y SIINFEKL ( $P < 0,01$ ). Al final del experimento, el volumen medio de los tumores en los

ratones tratados con OVA-PeptiCRAd fue menor que en todos los otros grupos ( $120,4 \pm 31,6 \text{ mm}^3$  vs.  $697,7 \pm 350 \text{ mm}^3$  en el simulado,  $255 \pm 61,5 \text{ mm}^3$  en SIINFEKL, y  $713,7 \pm 292,6 \text{ mm}^3$  en Ad5D24-CpG,  $489,7 \pm 73,2 \text{ mm}^3$  en Ad5D24-CpG+SIINFEKL; **Figura 15A**).

- 5 En dos puntos de tiempo diferentes (los días 7 y 16 para los puntos de tiempo tempranos y tardíos, respectivamente), los ratones se sacrificaron y se recogieron los bazo, los tumores y los ganglios linfáticos de drenaje para el análisis inmunológico. Este análisis puso de manifiesto la presencia de una gran población de células T CD8<sup>+</sup> específicas de SIINFEKL (células T CD8<sup>+</sup>OVA<sup>+</sup>) en los ganglios linfáticos de drenaje inguinal en el grupo de ratones tratados con PeptiCRAd (7,4 % en el día 7 y 3,2 % en el día 16). El mismo análisis no mostró una diferencia drástica en los tumores
- 10 en el punto temporal temprano, mientras que se observó un aumento sustancial en el punto temporal tardío (0,23 % en OVA-PeptiCRAd frente a 0,02 % en el simulado, 0,03 % en SIINFEKL, 0,01 % en Ad5D24-CpG y 0,02 % en Ad5D24-CpG + SIINFEKL en el día 16; **Figura 15B y C**).

- Luego estudiamos la correlación entre el tamaño de los tumores y la población de células T específicas de OVA
- 15 (células T CD8<sup>+</sup>OVA<sup>+</sup>) en el bazo, los ganglios linfáticos y los tumores. Calculamos el valor r de Pearson para estimar la naturaleza de la correlación (valor negativo, correlación negativa; valor positivo, correlación positiva) y observamos una correlación negativa entre el volumen del tumor y el grado de la respuesta anti-OVA (**Figura 15D**), lo que indica que los grupos de animales con tumores más pequeños correspondían a los grupos de animales con una población más robusta de células T CD8<sup>+</sup>OVA<sup>+</sup>. Después, se calculó el valor de  $r^2$  para cada conjunto de muestras para evaluar
- 20 la intensidad de esta correlación (bazo,  $r^2=0,5719$ ; ganglios linfáticos,  $r^2=0,6385$ ; tumores,  $r^2=0,7445$ ). Curiosamente, en los análisis de correlación, el grupo PeptiCRAd (puntos rojos en la **Figura 15D**) mostró uniformemente el volumen tumoral más pequeño y la mayor respuesta inmunológica.

- Finalmente, para profundizar nuestra comprensión de los mecanismos de PeptiCRAd, evaluamos la proporción de CD
- 25 maduras (células CD19<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>altas</sup>) que presentan el péptido SIINFEKL en MHC-I en los bazo de los ratones. En el punto de tiempo tardío, la proporción de DC maduras que presentaban SIINFEKL fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en los ratones tratados con OVA-PeptiCRAd que en los ratones tratados con Ad5D24-CpG + SIINFEKL no en forma de complejo. Cuando se consideran ambos puntos temporales, PeptiCRAd fue el único tratamiento que indujo un aumento en las DC maduras que presentaban SIINFEKL, como lo demuestra el aumento
- 30 de 9,67 veces en la población de DC CD86 OVA<sup>altas</sup> (**Figura 15E**).

Estos resultados sugieren que la expansión del grupo de DC maduro y específico del epítipo podría ser la base de la mayor eficacia antitumoral de PeptiCRAd.

### 35 ***El PeptiCRAd multivalente muestra actividad antitumoral mejorada hacia melanomas distantes no tratados.***

- Una de las principales ventajas del uso de vacunas oncolíticas es que la respuesta inmunitaria provocada facilita la dirección no solo de los tumores primarios sino también de la metástasis diseminada. Por este motivo, investigamos la eficacia antitumoral de PeptiCRAd para los tumores contralaterales no tratados en un modelo murino de melanoma.
- 40 En el mismo conjunto de experimentos, también estudiamos si la dirección de dos antígenos tumorales (a través de PeptiCRAds multivalentes), en lugar de uno solo, aumentaría la eficacia general. Por lo tanto, elegimos dos epítomos restringidos por MHC-I específicos del tumor para recubrir el virus oncolítico Ad5D24-CpG: SVYDFFVWL (TRP-2<sub>180-188</sub>; restringido a la molécula MHC-I murina H-2K<sup>b</sup>) y KVPRNQDWL (gp100<sub>25-33</sub> o hgp100 humana; restringido a la molécula MHC-I murina H-2D<sup>b</sup> (40)). Para estos experimentos, empleamos el melanoma altamente agresivo B16-F10,
- 45 que expresa ambos antígenos tumorales (41). Los péptidos se modificaron con una cadena poliK en su extremo N para favorecer su adsorción en la cápside viral, como antes para SIINFEKL.

- En primer lugar, implantamos  $1 \times 10^5$  B16-F10 células en el flanco derecho de ratones C57BL/6. Después de 10 días, los tratamientos se iniciaron de la siguiente manera: i) solución salina (simulada), ii) virus oncolítico desnudo (Ad5D24-CpG) y iii) TRP-2-hgp100-PeptiCRAd de doble recubrimiento. Los tratamientos se administraron por vía intratumoral
- 50 cada dos días, como se muestra en el esquema de la **Figura 6A**. Dos días después de la última ronda de inyecciones, se inyectaron  $3 \times 10^5$  B16-F10 células en el flanco izquierdo de los ratones, y se siguió el crecimiento de melanomas. Los ratones tratados con PeptiCRAd de doble recubrimiento mostraron un crecimiento tumoral significativamente reducido ( $P < 0,001$ ) en comparación con el control (en el día 11; **Figura 16A**). El análisis de tumores secundarios y
- 55 no tratados puso de manifiesto una ventaja del PeptiCRAd de doble recubrimiento sobre todos los otros grupos. En particular, al final del experimento, los tumores secundarios en este grupo fueron significativamente más pequeños en comparación con los de los controles que recibieron solución salina o solo Ad5D24-CpG ( $P < 0,01$ ; **Figura 16B**).

- Para aclarar mejor los mecanismos que respaldan estos resultados, realizamos un análisis de citometría de flujo para
- 60 estudiar las respuestas de células T específicas para ambos epítomos. En ratones tratados con TRP-2-hgp100

PeptiCRAd, observamos una mayor población acumulada de células T CD8<sup>+</sup> específicas de epítipo (**Figura 16C**) que en todos los otros grupos.

En conjunto, estos resultados demuestran que el enfoque de PeptiCRAd es eficaz contra un modelo de melanoma menos inmunogénico y más agresivo. Además, la dirección a múltiples antígenos da como resultado un fuerte efecto tanto en los tumores tratados como en los no tratados. Por lo tanto, es posible generar PeptiCRAd multivalentes, y pueden darnos la posibilidad de dirigir a diferentes antígenos tumorales, superando así algunos escapes inmunológicos del tumor.

#### 10 ***PeptiCRAd muestra una eficacia mejorada y una inmunidad antitumoral en ratones humanizados con tumores humanos.***

Finalmente, quisimos evaluar la eficacia de PeptiCRAd en un modelo que podría proporcionar información sobre la viabilidad de su traducción al entorno clínico. Por lo tanto, elegimos un modelo de ratón humanizado más sofisticado.

- 15 Con este fin, los ratones con triple eliminación, (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>-IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ, o NSG) se injertaron primero con la línea celular de melanoma humano SK-MEL-2. Cuando el tumor alcanzó un tamaño palpable, las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) parcialmente compatibles de un donante sano se injertaron en los mismos ratones. Un día después, los ratones se trataron con PeptiCRAd, virus sin recubrimiento o solución salina. Para este experimento, elegimos un péptido derivado del antígeno A1 asociado con el melanoma (MAGE-A1<sub>96-104</sub>; SLFRAVITK) y lo modificó para permitir la interacción con la cápside viral (poliK-SLFRAVITK). En este experimento, mientras estudiábamos un sistema inmunitario completamente humano, seleccionamos un GM-CSF humano que expresaba OAd, que previamente hemos demostrado que tiene una actividad mejorada en un sistema inmunocompetente, incluso en pacientes con cáncer (8).

- 25 Encontramos que MAGE-A1 PeptiCRAd mostró una mayor eficacia en comparación con los tratamientos de control, como lo demuestra la rápida reducción en el volumen del tumor (**Figura 17A y B**). Finalmente, investigamos si una respuesta inmunológica más fuerte podría explicar el aumento de la eficacia antitumoral de PeptiCRAd en este modelo. Con este fin, se estudió la presencia de células T CD8<sup>+</sup> específicas de MAGE-A1<sub>96-104</sub> mediante tinción con pentámero, (**Figura 17C**), y descubrimos la mayor población de células T humanas específicas de MAGE (CD8<sup>+</sup>MAGE-A1<sup>+</sup>) en los bazo de ratones tratados con PeptiCRAd.

Estos datos confirman nuestros hallazgos anteriores de que PeptiCRAd estimula la respuesta inmunitaria específica del tumor al aprovechar la inmunogenicidad natural de los virus oncolíticos, lo que mejora la eficacia de la inmunoviroterapia para el cáncer.

#### 35 ***Análisis de polipéptidos específicos de MHC-I en cualquier enfermedad y recubrimiento de la cápside adenoviral y usos de los mismos***

- 40 Cualquier polipéptido(s) específico(s) de MHC-I se identifica(n) comparando polipéptidos restringidos por MHC-I representados por DC y células de enfermedad infectadas de un sujeto. Uno o más polipéptidos presentados por ambos grupos celulares se seleccionan para recubrir un vector adenoviral.

Cualquier vector adenoviral se selecciona y se recubre de acuerdo con cualquier método descrito en el método 2.

- 45 Los vectores recubiertos se usan para tratar la enfermedad de un paciente.

#### **Bibliografía**

1. Mocellin, S (2012). Peptides in melanoma therapy. Curr Pharm Des 18: 820-831.
- 50 2. Lipscomb, MF and Masten, BJ. Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. physrev.physiology.org.
3. Degli-Esposti, MA and Smyth, MJ (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nat Rev Immunol 5: 112-124.
4. Trinchieri, G, Aden, DP and Knowles, BB (1976). Cell-mediated cytotoxicity to SV40-specific tumour-associated
- 55 5. Steinman, RM, Hawiger, D and Nussenzweig, MC (2003). Tolerogenic dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 21: 685-711.
6. Wongthida, P, Diaz, RM, Galivo, F, Kottke, T, Thompson, J, Melcher, A, et al. (2011). VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling. Mol Ther 19: 150-158.

7. Prestwich, RJ, Errington, F, Diaz, RM, Pandha, HS, Harrington, KJ, Melcher, AA, et al. (2009). The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Hum Gene Ther* 20: 1119-1132.
8. Cerullo, V, Pesonen, S, Diaconu, I, Escutenaire, S, Arstila, PT, Ugolini, M, et al. (2010). Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumoral immunity in cancer patients. *Cancer Res* 70: 4297-4309.
9. Heise, C, Hermiston, T, Johnson, L, Brooks, G, Sampson-Johannes, A, Williams, A, et al. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6: 1134-1139.
10. Heise, C, Sampson-Johannes, A, Williams, A, McCormick, F, Hoff, von, DD and Kirn, DH (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 3: 639-645.
11. Nowak, AK, Lake, RA, Marzo, AL, Scott, B, Heath, WR, Collins, EJ, et al. (2003). Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol* 170: 4905-4913.
12. Zitvogel, L, Apetoh, L, Ghiringhelli, F and Kroemer, G (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 8: 59-73.
13. van der Most, RG, Currie, AJ, Robinson, BWS and Lake, RA (2008). Decoding dangerous death: how cytotoxic chemotherapy invokes inflammation, immunity or nothing at all. *Cell Death Differ* 15: 13-20.
14. Istrail, S, Florea, L, Halldórsson, BV, Kohlbacher, O, Schwartz, RS, Yap, VB, et al. (2004). Comparative immunopeptidomics of humans and their pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13268-13272.
15. Cerullo, V, Pesonen, S, Diaconu, I, Escutenaire, S, Arstila, PT, Ugolini, M, et al. (2010). Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumoral immunity in cancer patients. *Cancer Res* 70: 4297-4309.
16. Cerullo, V, Seiler, MP, Mane, V, Brunetti-Pierri, N, Clarke, C, Bertin, TK, et al. (2007). Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* 15: 378-385.
17. Suzuki, M, Cerullo, Bertin, T, Cela, Clarke, Guenther, M, et al. (2009). MyD88-dependent silencing of transgene expression during the innate and adaptive immune response to Helper-dependent adenovirus. *Hum Gene Ther* doi:10.1089/hum.2009.155.
18. Suzuki, M, Cela, R, Bertin, TK, Sule, G, Cerullo, V, Rodgers, JR, et al. (2011). NOD2 signaling contributes to the innate immune response against helper-dependent adenovirus vectors independently of MyD88 in vivo. *Hum Gene Ther* 22: 10 1082.
19. Muruve, DA, Pétrilli, V, Zaiss, AK, White, LR, Clark, SA, Ross, PJ, et al. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452: 103-107.
20. Tewalt, EF, Grant, JM, Granger, EL, Palmer, DC, Heuss, ND, Gregerson, DS, et al. (2009). Viral Sequestration of Antigen Subverts Cross Presentation to CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* 5: e1000457.
21. Cerullo, V, Seiler, MP, Mane, VP, Brunetti-Pierri, N, Clarke, C, Bertin, TK, et al. (2007). Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* 15: 378-385.
22. Suzuki, M, Cerullo, V, Bertin, TK, Cela, R, Clarke, C, Guenther, M, et al. (2010). MyD88-dependent silencing of transgene expression during the innate and adaptive immune response to helper-dependent adenovirus. *Hum Gene Ther* 21: 325-336.
23. Seiler, MP, Gottschalk, S, Cerullo, V, Ratnayake, M, Mane, VP, Clarke, C, et al. (2007). Dendritic cell function after gene transfer with adenovirus-calcium phosphate co-precipitates. *Mol Ther* 15: 386-392.
24. Suzuki, M, Cela, R, Bertin, TK, Sule, G, Cerullo, V, Rodgers, JR, et al. (2011). NOD2 Signaling Contributes to the Innate Immune Response Against Helper-Dependent Adenovirus Vectors Independently of MyD88 In Vivo. *Hum Gene Ther* doi:10.1089/hum.2011.002.
25. Fortier, M-H, Caron, E, Hardy, M-P, Voisin, G, Lemieux, S, Perreault, C, et al. (2008). The MHC class I peptide repertoire is molded by the transcriptome. *Journal of Experimental Medicine* 205: 595-610.
26. Fasbender, A, Zabner, J, Chillon, M, Moninger, TO, Puga, AP, Davidson, BL, et al. (1997). Complexes of adenovirus with polycationic polymers and cationic lipids increase the efficiency of gene transfer in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 272: 6479-6489.
27. Croyle, MA, Yu, QC and Wilson, JM (2000). Development of a rapid method for the PEGylation of adenoviruses with enhanced transduction and improved stability under harsh storage conditions. *Hum Gene Ther* 11: 1713-1722.
28. Wonganan, P and Croyle, MA (2010). PEGylated Adenoviruses: From Mice to Monkeys. *Viruses* 2: 468-502.
29. Toyoda, K, Ooboshi, H, Chu, Y, Fasbender, AI, Davidson, BL, Welsh, MJ, et al. Cationic Polymer and Lipids Enhance Adenovirus-Mediated Gene Transfer to Rabbit Carotid Artery. [stroke.ahajournals.org](http://stroke.ahajournals.org).
30. Cerullo, V, Diaconu, I, Romano, V, Hirvinen, M, Ugolini, M, Escutenaire, S, et al. (2012). An Oncolytic Adenovirus Enhanced for Toll-like Receptor 9 Stimulation Increases Antitumor Immune Responses and Tumor Clearance. *Mol Ther* 20, 2076.

31. Cerullo, V, Diaconu, I, Romano, V, Hirvinen, M, Ugolini, M, Escutenaire, S, et al. (2012). An Oncolytic Adenovirus Enhanced for Toll-like Receptor 9 Stimulation Increases Antitumor Immune Responses and Tumor Clearance. *Mol Ther* 20, 2076.
- 5 32. Dias, JD, Liikanen, I, Guse, K, Foloppe, J, Sloniecka, M, Diaconu, I, et al. (2010). Targeted chemotherapy for head and neck cancer with a chimeric oncolytic adenovirus coding for bifunctional suicide protein FCU1. *Clin Cancer Res* 16: 2540-2549.
33. Edukulla, R, Woller, N, Mundt, B, Knocke, S, Gurlevik, E, Saborowski, M, et al. (2009). Antitumoral immune response by recruitment and expansion of dendritic cells in tumors infected with telomerase-dependent oncolytic viruses. *Cancer Res* 69: 1448-1458.
- 10 34. R. B. Dell, S. Holleran, R. Ramakrishnan, Sample size determination. *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 43, 207 (2002).
35. M. W. Moore, F. R. Carbone, M. J. Bevan, Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54, 777 (Sep 9, 1988).
- 15 36. A. Fasbender et al., Complexes of adenovirus with polycationic polymers and cationic lipids increase the efficiency of gene transfer in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 272, 6479 (Mar 7, 1997).
37. C. Heise et al., An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature medicine* 6, 1134 (Oct, 2000).
38. Y. Deng et al., Assembly of MHC class I molecules with biosynthesized endoplasmic reticulum-targeted peptides is inefficient in insect cells and can be enhanced by protease inhibitors. *J Immunol* 161, 1677 (Aug 15, 1998).
- 20 39. V. Cerullo et al., An oncolytic adenovirus enhanced for toll-like receptor 9 stimulation increases antitumor immune responses and tumor clearance. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 2076 (Nov, 2012).
40. W. W. Overwijk et al., gp100/pmel 17 is a murine tumor rejection antigen: induction of "self"-reactive, tumoricidal T cells using high-affinity, altered peptide ligand. *The Journal of experimental medicine* 188, 277 (Jul 20, 1998).
- 25 41. W. W. Overwijk, N. P. Restifo, B16 as a mouse model for human melanoma. *Current protocols in immunology/edited by John E. Coligan...* [et al.] Chapter 20, Unit 20 1 (May, 2001).

#### LISTA DE SECUENCIAS

- 30 <110> Helsingin yliopisto  
<120> Adenovirus modificados para el desarrollo de vacunas contra el cáncer  
<130> 2140609PC  
<160> 7
- 35 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>  
<223> fragmento de péptido  
<400> 1
- Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
1 5
- 45 <210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<223> fragmento de péptido  
<400> 2
- Ser Ile Ile Asn Phe Asp Leu  
1 5
- 55 <210> 3  
<211> 8  
<212> PRT

|                                                                                                                                                                                  |                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <p>5</p> <p>&lt;213&gt; Secuencia artificial<br/>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; fragmento de péptido<br/>&lt;400&gt; 3</p>                                                          | <p>Phe Ile Leu Lys Ser Ile Asn Glu<br/>1 5</p>     |
| <p>10</p> <p>&lt;210&gt; 4<br/>&lt;211&gt; 9<br/>&lt;212&gt; PRT<br/>&lt;213&gt; Secuencia artificial<br/>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; fragmento de péptido<br/>&lt;400&gt; 4</p> | <p>Ser Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys<br/>1 5</p> |
| <p>20</p> <p>&lt;210&gt; 5<br/>&lt;211&gt; 9<br/>&lt;212&gt; PRT<br/>&lt;213&gt; Secuencia artificial<br/>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; fragmento de péptido<br/>&lt;400&gt; 5</p> | <p>Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu<br/>1 5</p> |
| <p>30</p> <p>&lt;210&gt; 6<br/>&lt;211&gt; 9<br/>&lt;212&gt; PRT<br/>&lt;213&gt; Secuencia artificial<br/>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; fragmento de péptido<br/>&lt;400&gt; 6</p> | <p>Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu<br/>1 5</p> |
| <p>40</p> <p>&lt;210&gt; 7<br/>&lt;211&gt; 8<br/>&lt;212&gt; PRT<br/>&lt;213&gt; Secuencia artificial<br/>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; fragmento de péptido<br/>&lt;400&gt; 7</p> | <p>Ser Ile Ile Asn Phe Glu Asp Leu<br/>1 5</p>     |

## REIVINDICACIONES

1. Un vector adenoviral oncolítico que comprende polipéptidos unidos a la cápside viral donde dichos polipéptidos pueden estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto y, además, donde los polipéptidos no han sido codificados genéticamente por dicho vector adenoviral pero se han unido a la cápside de forma covalente o no covalente donde los polipéptidos unidos a la cápside viral son al mismo tiempo específicos del complejo de histocompatibilidad principal de clase I (MHC-I) o específicos del complejo de histocompatibilidad principal de clase II (MHC-II) y polipéptidos específicos de tumores.
2. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichos polipéptidos se seleccionan de entre el grupo que consiste en polipéptidos anti-tumorales, anti-cáncer, anti-infección y anti-virus.
3. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con la reivindicación 2, donde el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer nasofaríngeo, cáncer sinovial, cáncer hepatocelular, cáncer renal, cáncer de tejidos conectivos, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de intestino, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, cáncer cerebral, cáncer de garganta, cáncer de boca, cáncer de hígado, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, coriocarcinoma, gastrinoma, feocromocitoma, prolactinoma, leucemia/linfoma de células T, neuroma, enfermedad de von Hippel-Lindau, síndrome de Zollinger-Ellison, cáncer adrenal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de uréter, cáncer de cerebro, oligodendroglioma, neuroblastoma, meningioma, tumor de la médula espinal, cáncer de hueso, osteocondroma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, cáncer de sitio primario desconocido, carcinoide, carcinoide del tracto gastrointestinal, fibrosarcoma, cáncer de mama, enfermedad de Paget, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer de esófago, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de cabeza, cáncer de ojo, cáncer de cuello, cáncer de riñón, tumor de Wilm, cáncer de hígado, sarcoma de Kaposi, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de testículos, enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, cáncer de boca, cáncer de piel, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer pancreático endocrino, glucagonoma, cáncer pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de pituitarias, sarcoma de tejidos blandos, retinoblastoma, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de timo, cáncer de tiroides, cáncer trofoblástico, mola hidatiforme, cáncer de útero, cáncer endometrial, cáncer de vagina, cáncer de vulva, neurinoma del acústico, micosis fungoide, insulinooma, síndrome carcinoide, somatostatinooma, cáncer de encía, cáncer de corazón, cáncer de labio, cáncer de meninges, cáncer de boca, cáncer del sistema nervioso, cáncer del paladar, cáncer de la glándula parótida, cáncer de peritoneo, cáncer de faringe, cáncer de la pleura, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de lengua y cáncer de amígdala.
4. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, donde el sujeto es un ser humano o un animal.
5. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el vector adenoviral está formulado para la inyección intratumoral, intra-arterial, intravenosa, intrapleurar, intravesicular, intracavitaria o peritoneal, o una administración oral.
6. Un método para modificar la cápside de un adenovirus oncolítico, donde dicho método comprende la unión de polipéptidos modificados con polilisina a la cápside adenoviral de forma covalente o no covalente, donde el vector adenoviral modificado es capaz de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido contra dichos polipéptidos en un sujeto.
7. Uso de polipéptidos modificados con polilisina, que son capaces de estimular una respuesta inmunitaria específica de péptido en un sujeto, para recubrir la cápside de un adenovirus oncolítico mediante la unión covalente o no covalente de los polipéptidos a la cápside.
8. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, el método de la reivindicación 6 o el uso de la reivindicación 7, donde los polipéptidos se han unido a la cápside por enlace electrostático, disulfuro o amida, o se han suministrado conjuntamente y se han unido en una sola nanopartícula.
9. El vector adenoviral oncolítico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 8, el método de las reivindicaciones 6 u 8, o el uso de las reivindicaciones 7 u 8, donde el polipéptido unido a la cápside viral son todos los mismos polipéptidos o polipéptidos diferentes seleccionados de entre dos o más tipos de polipéptidos diferentes.
10. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 8 o 9, el método de las reivindicaciones 6, 8 o 9, o el uso de las reivindicaciones 7-9, donde el serotipo de la estructura del vector adenoviral se selecciona de entre el serotipo 3 o 5.

11. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 8-10, el método de las reivindicaciones 6, u 8-10, o el uso de las reivindicaciones 7-10, donde el vector adenoviral comprende la eliminación de 24 pb o la eliminación del gen E1 o el vector es un vector dependiente del auxiliar.
- 5 12. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 8-11, el método de las reivindicaciones 6, u 8-11, o el uso de las reivindicaciones 7-11, donde el vector adenoviral comprende uno o más transgenes.
- 10 13. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 8-12, el método de las reivindicaciones 6, u 8-12, o el uso de las reivindicaciones 7-12, donde el vector adenoviral comprende una modificación de la cápside.
14. El vector adenoviral oncolítico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 8-13, el método  
15 de las reivindicaciones 6, u 8-13, o el uso de las reivindicaciones 7-13, donde el vector adenoviral es Ad5/3 o Ad5/35 que comprende una estructura de ácido nucleico Ad5 y un botón de fibra seleccionado de entre el grupo que consiste en un botón de fibra Ad3, un botón de fibra Ad35, un botón de fibra quimérica Ad5/3 y un botón de fibra quimérica Ad5/35.
- 20 15. Una composición farmacéutica que comprende el vector adenoviral oncolítico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 8-14.

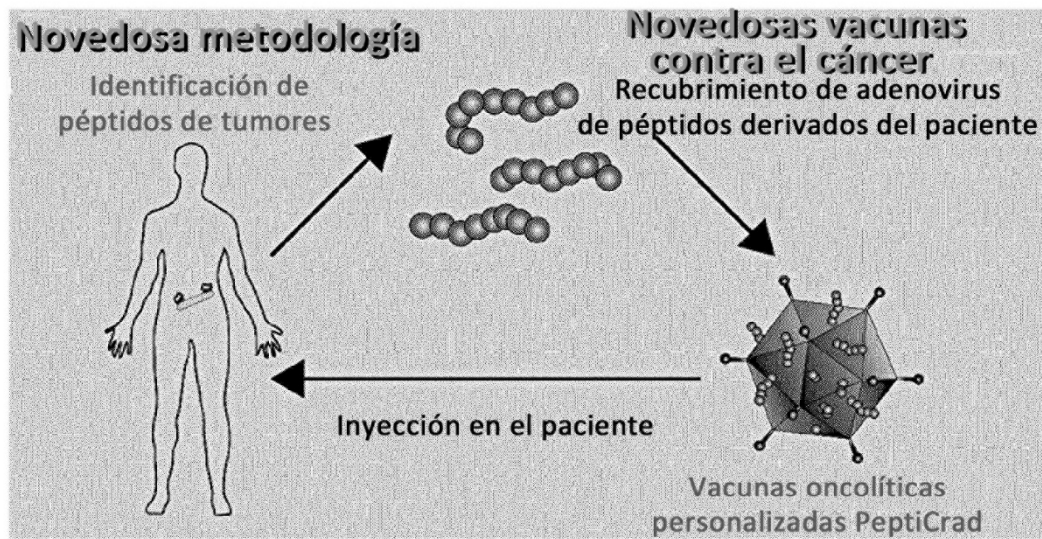


Figura 1.

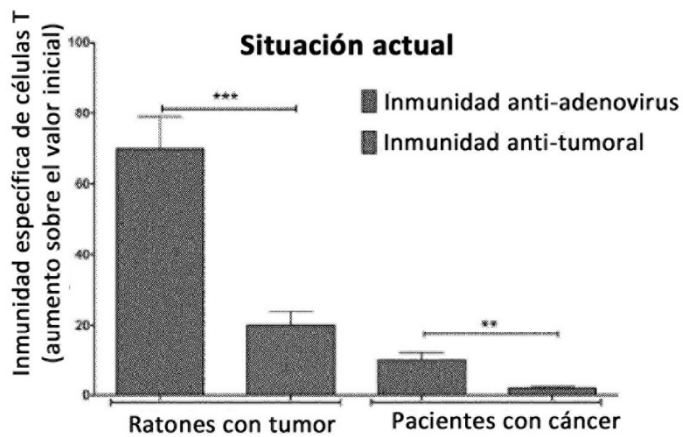


Figura 2.

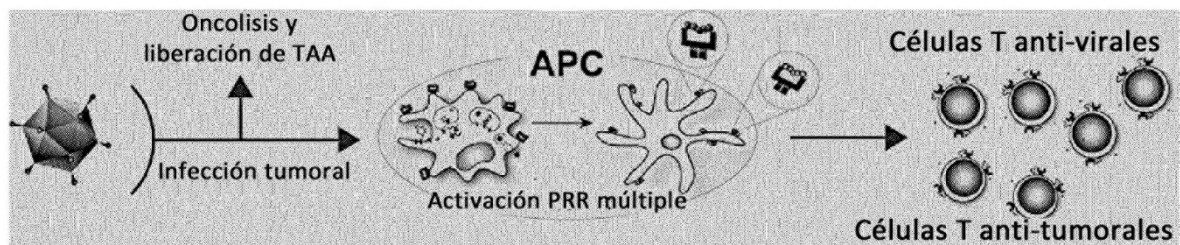


Figura 3A.

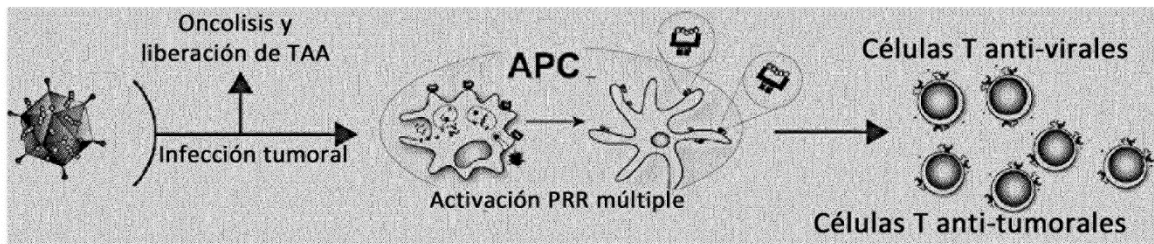


Figura 3B.

Análisis: funciones seleccionadas de CpGvs simuladas- solo las DC

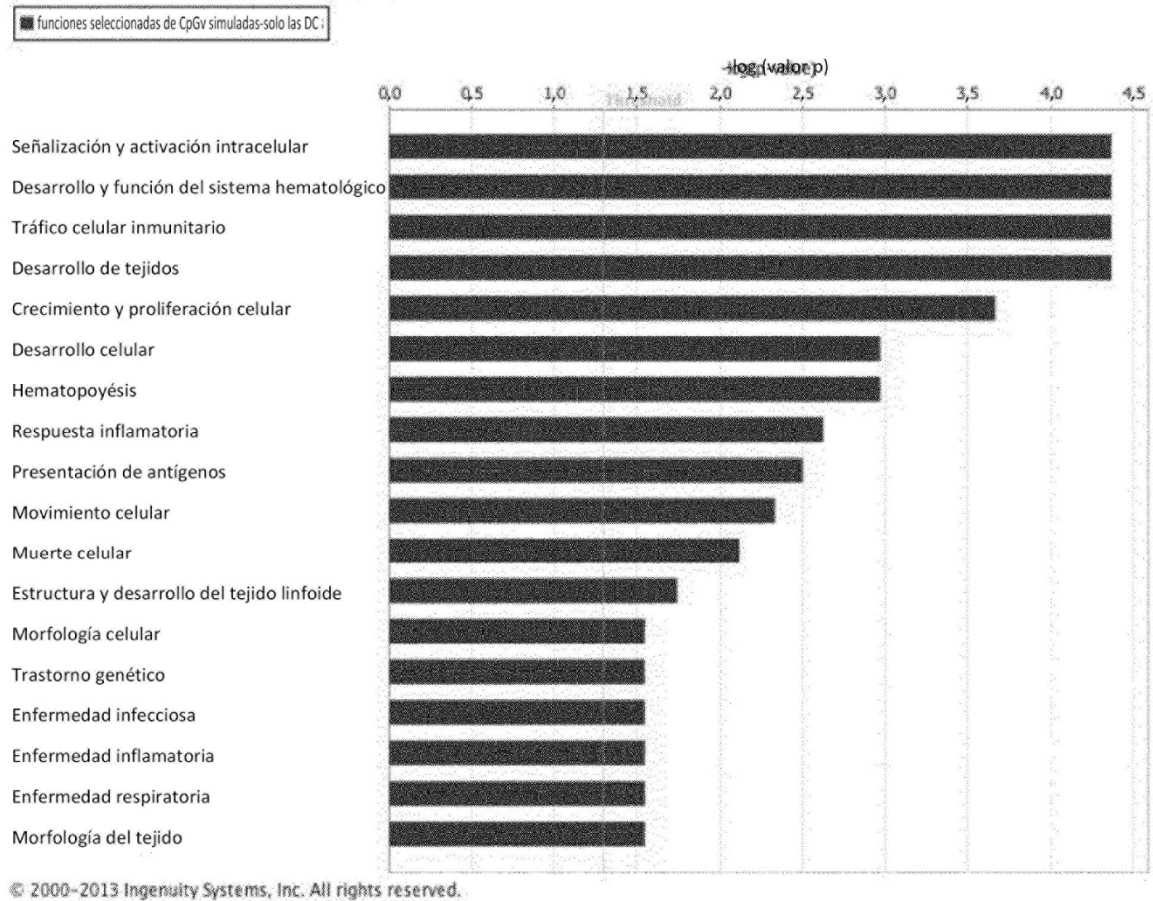


Figura 4.

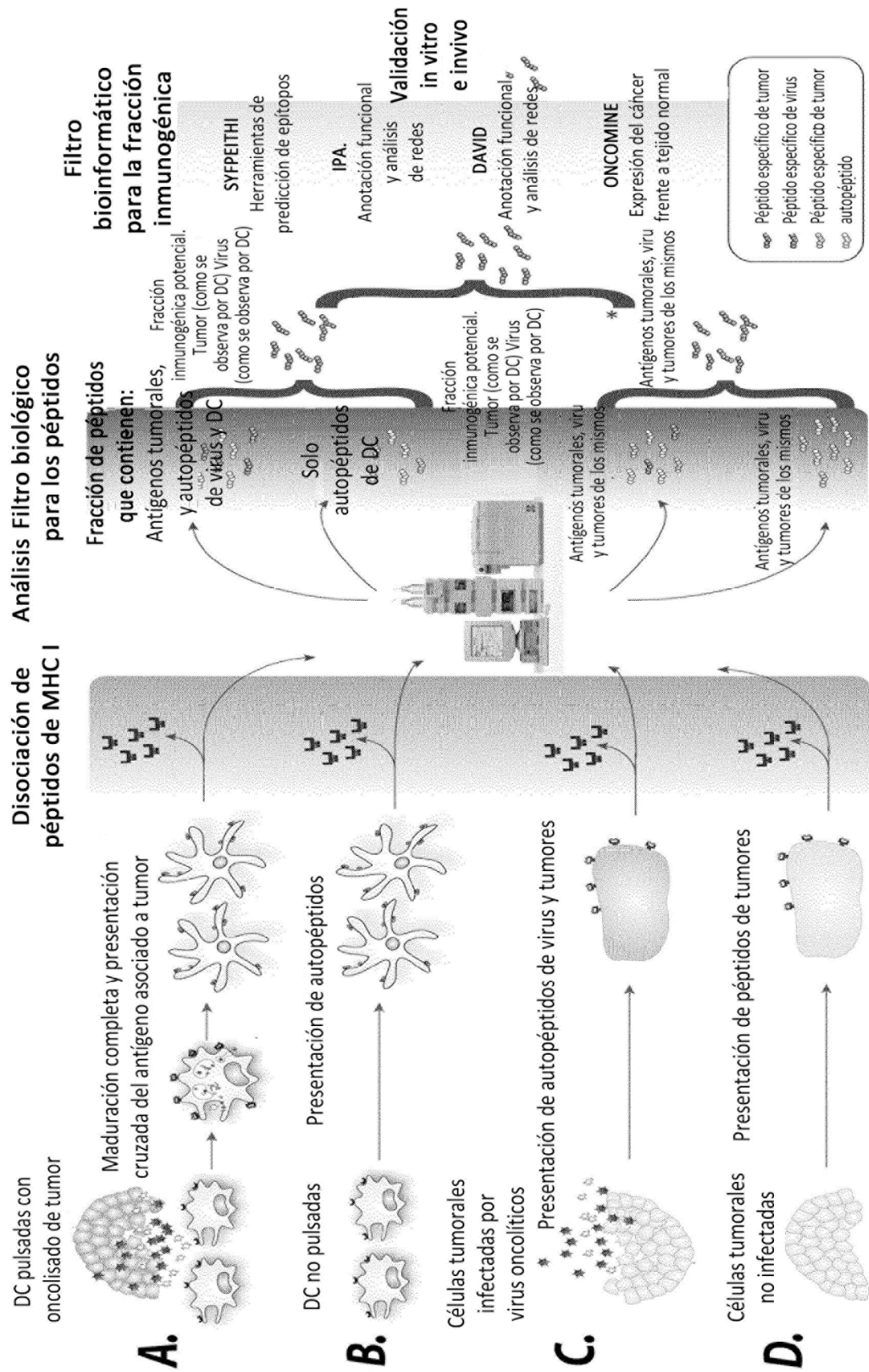
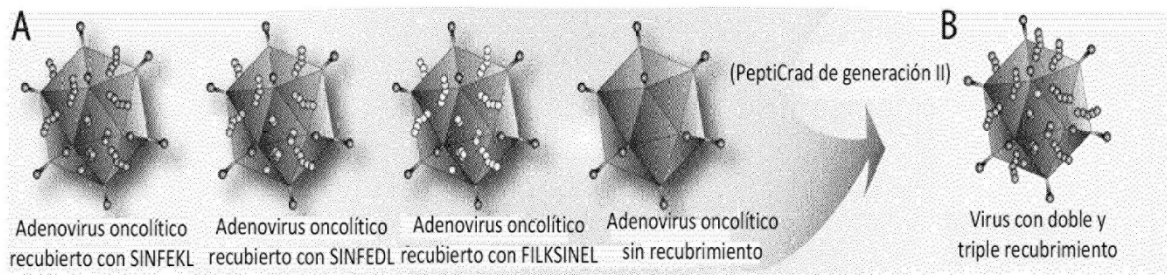


Figura 5.



Figuras 6A-B.

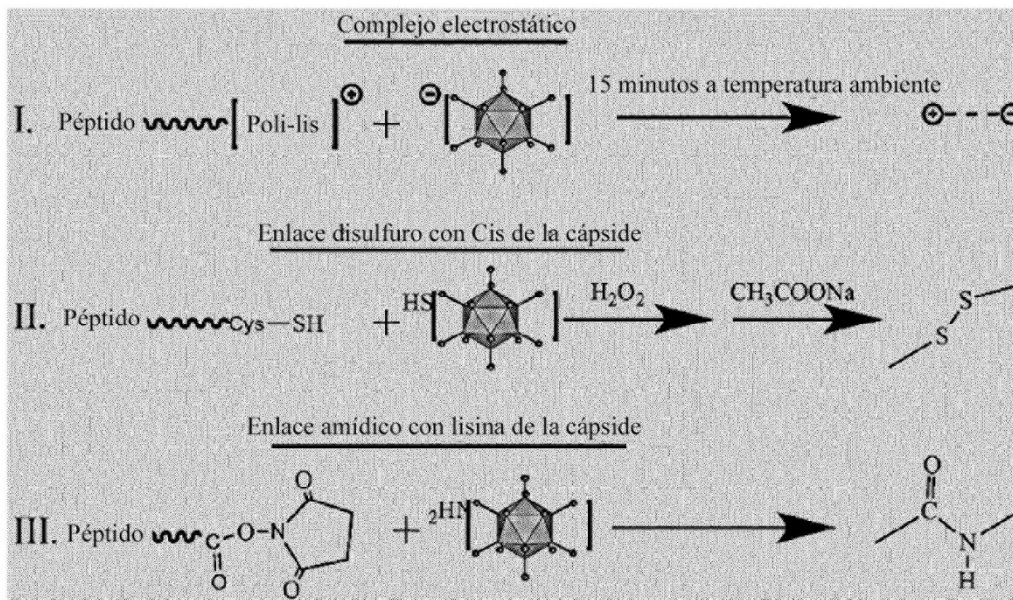


Figura 7.

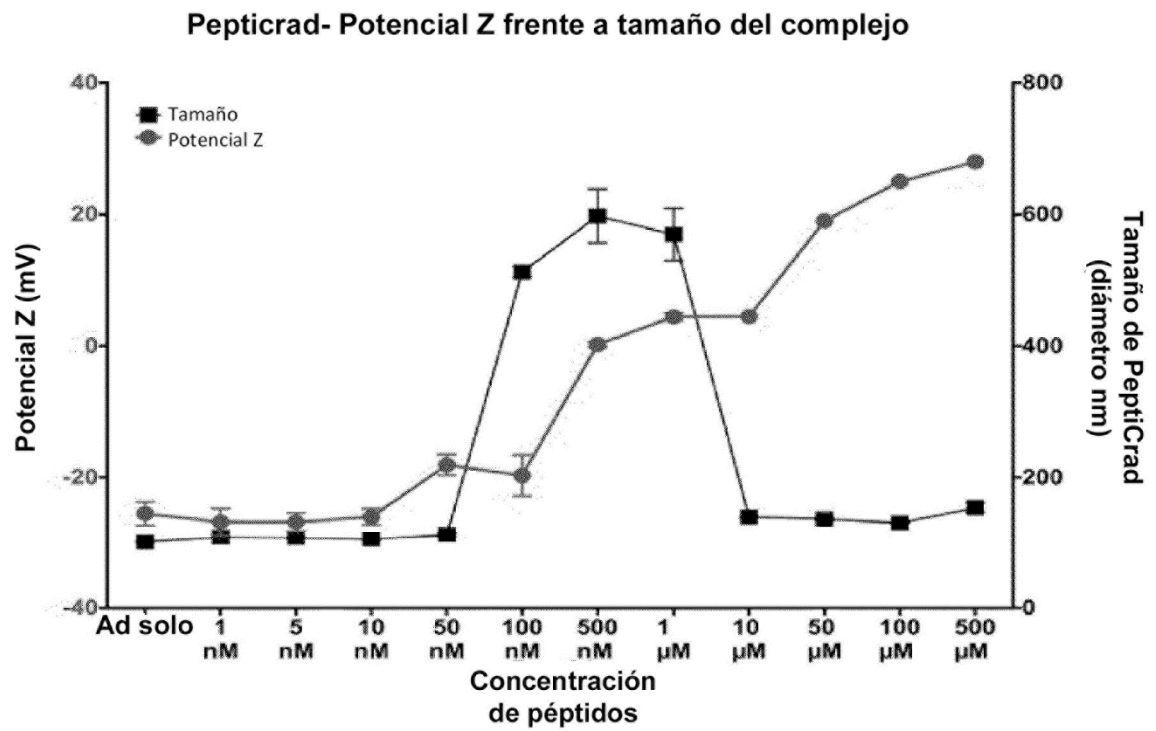


Figura 8A.

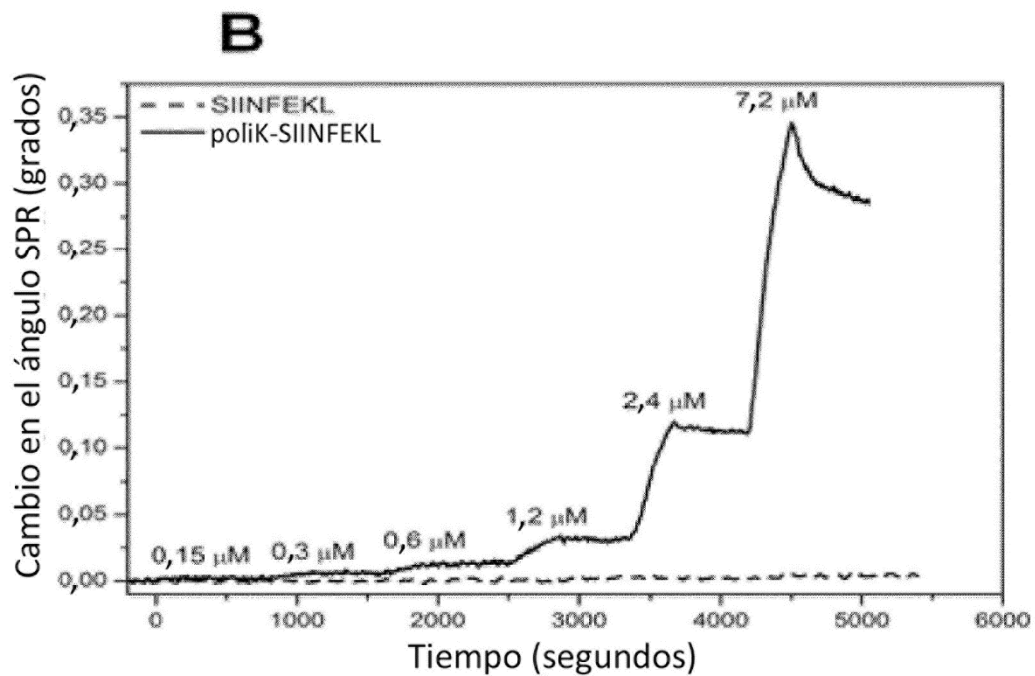


Figura 8B.

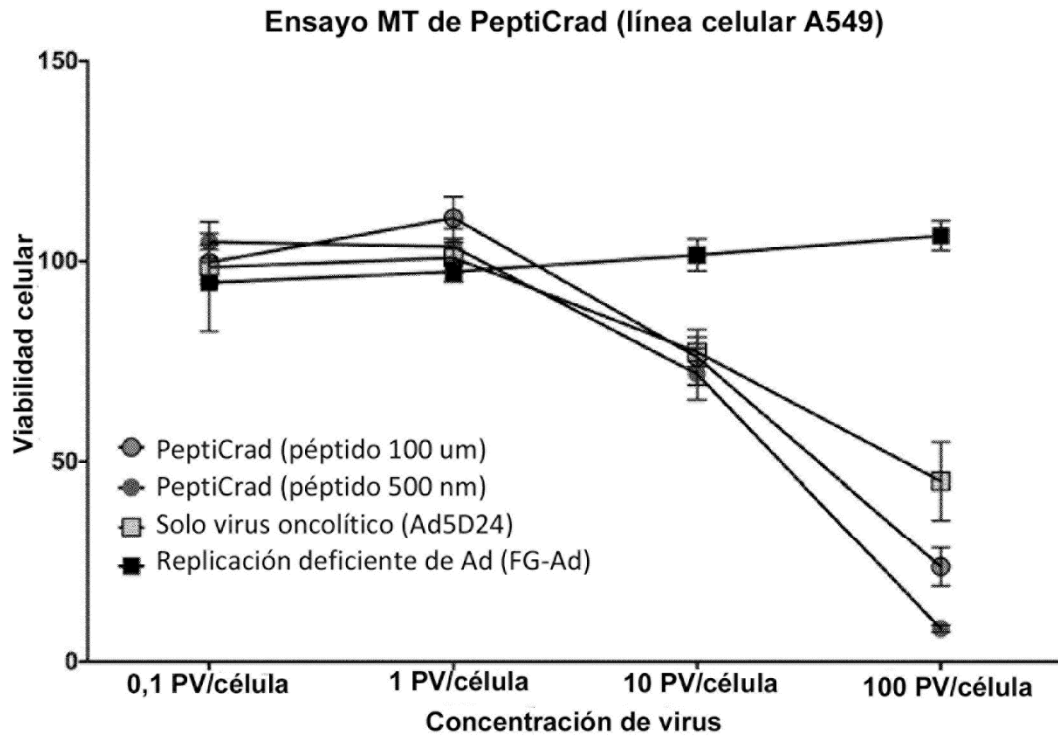


Figura 9.

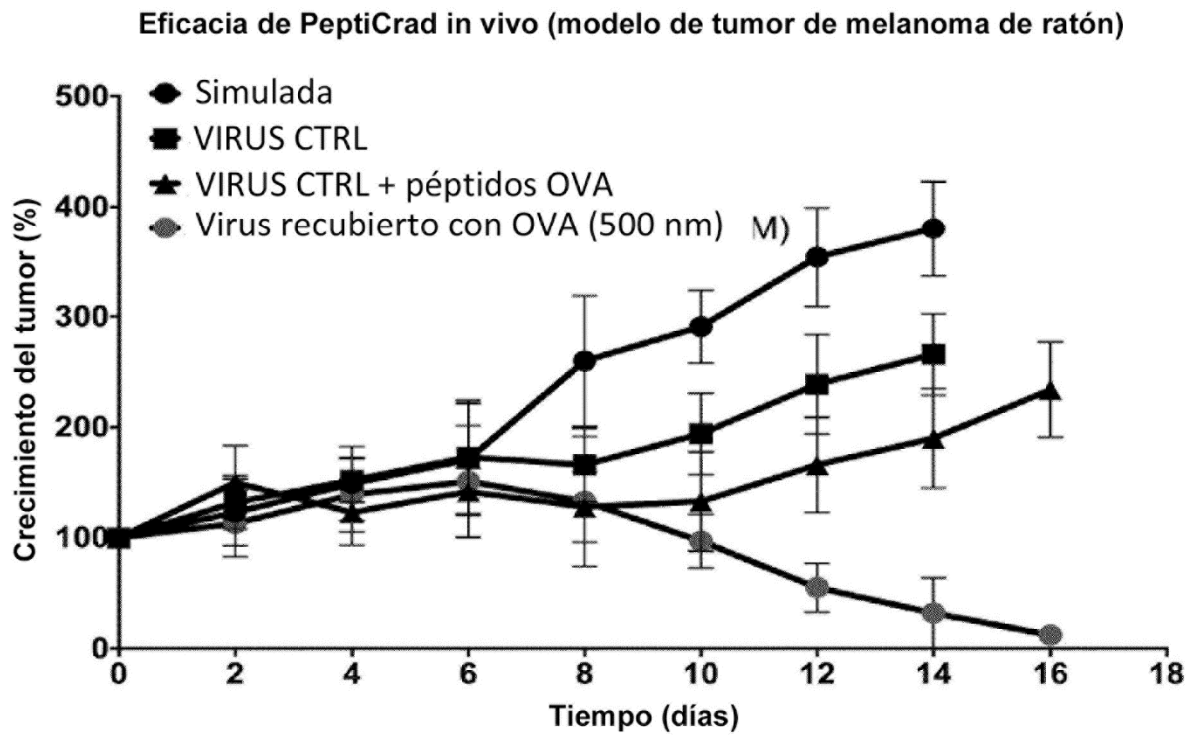


Figura 10A.

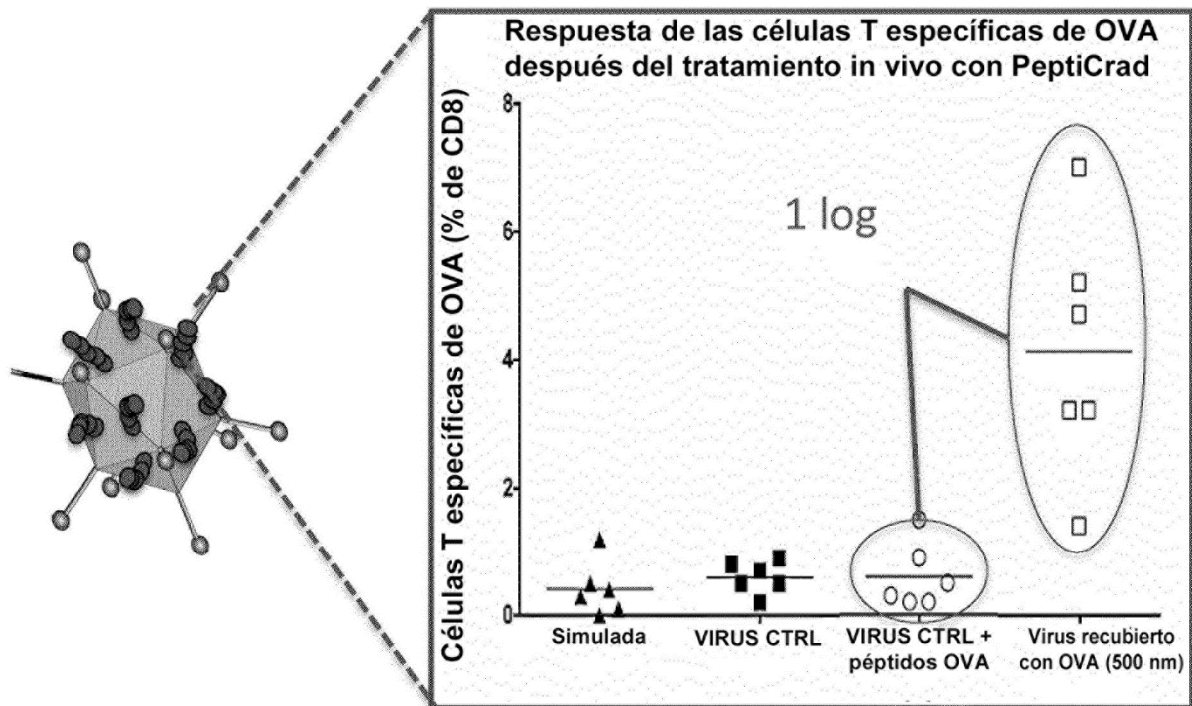


Figura 10B.

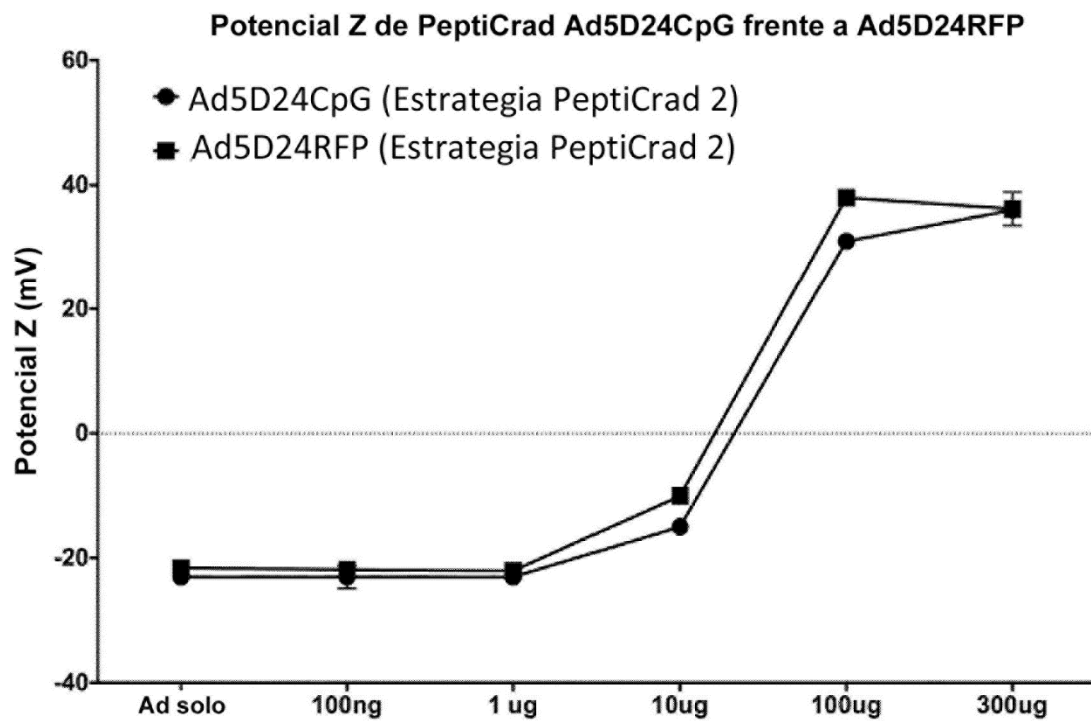


Figura 11.

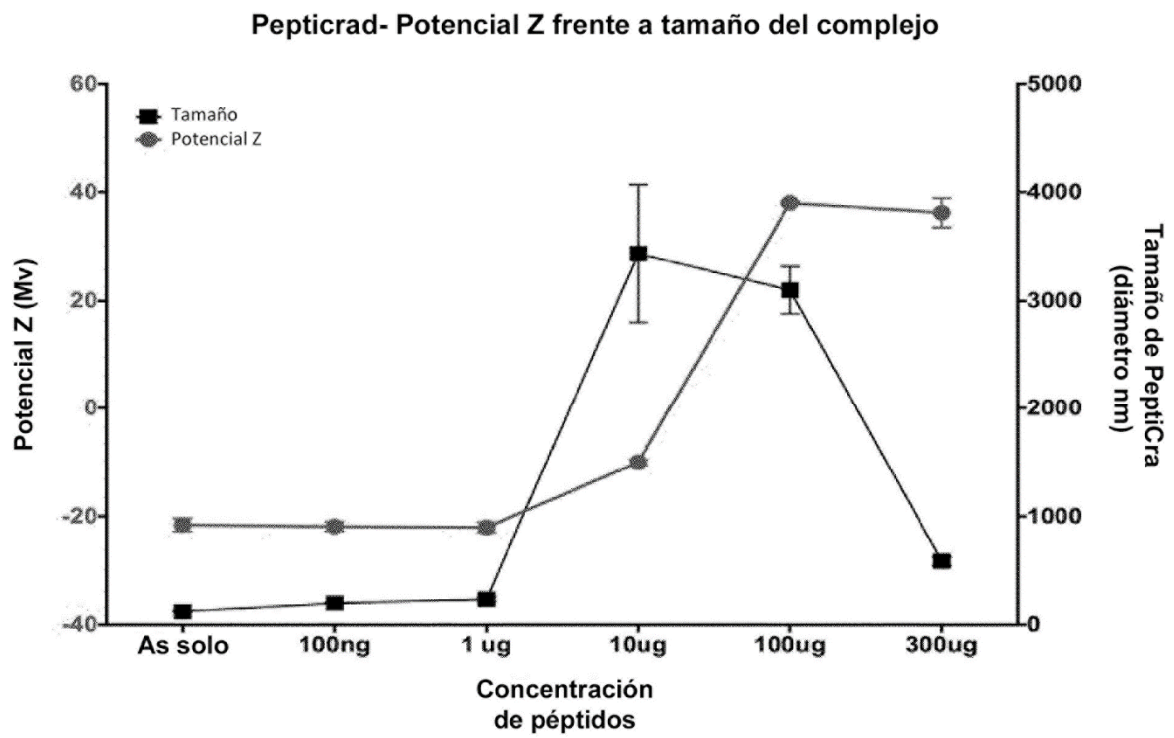


Figura 12.

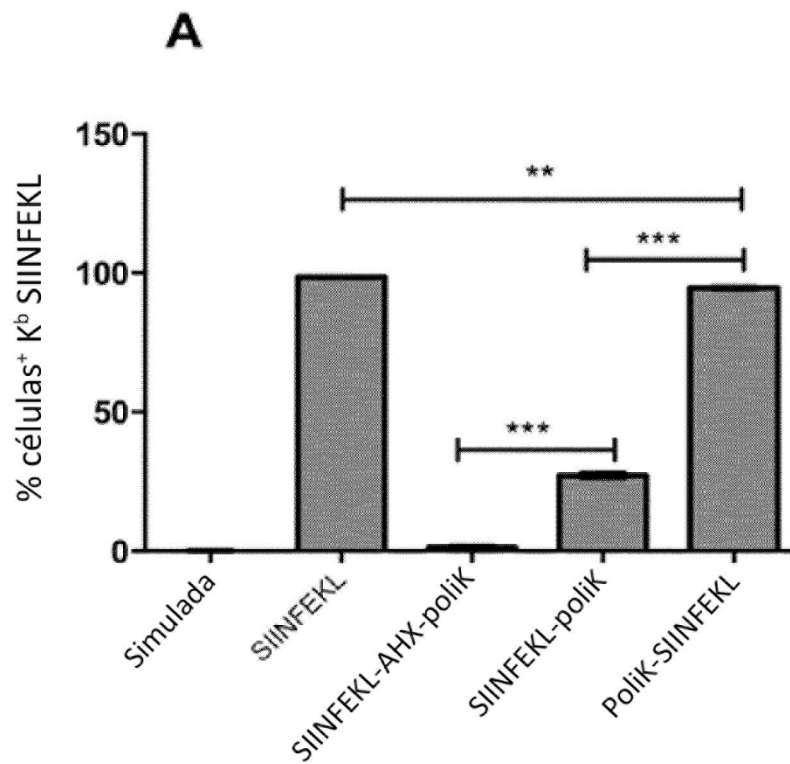


Figura 13A.

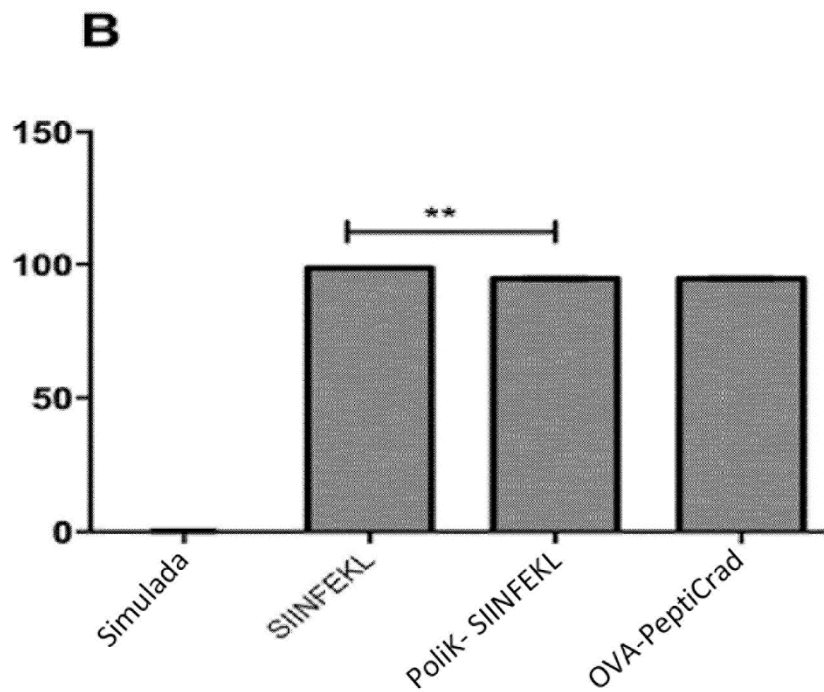
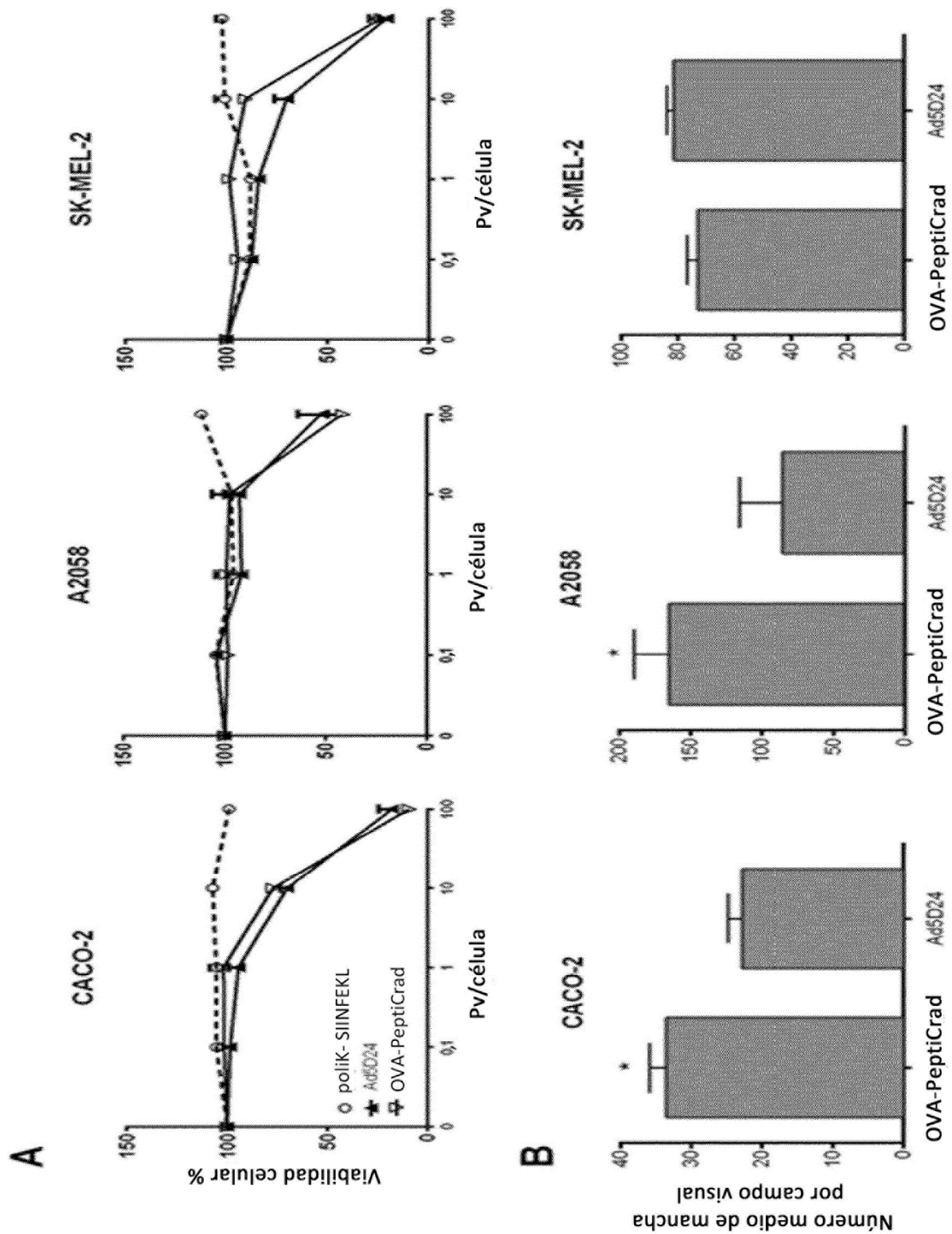


Figura 13B.



Figuras 14A y B.

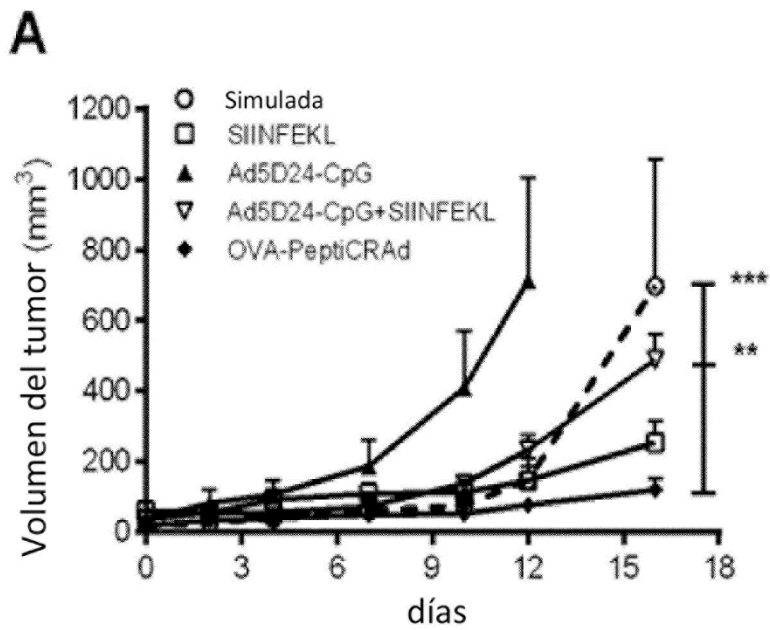


Figura 15A.

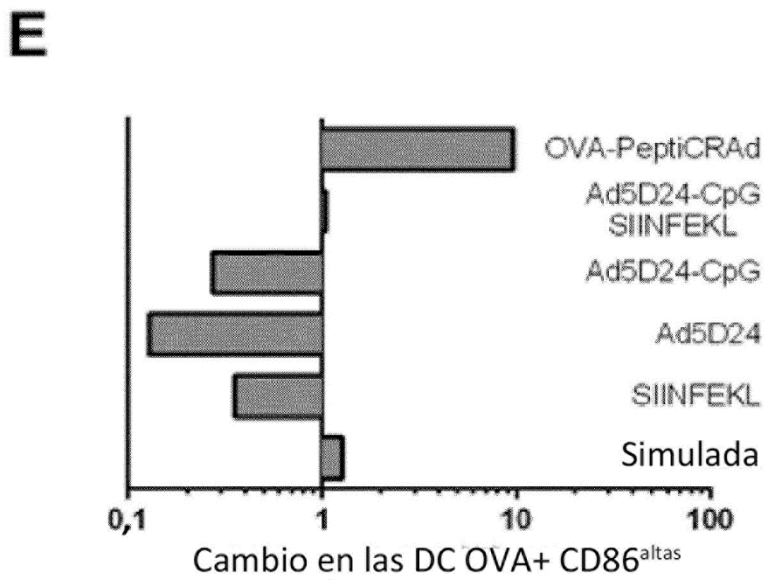
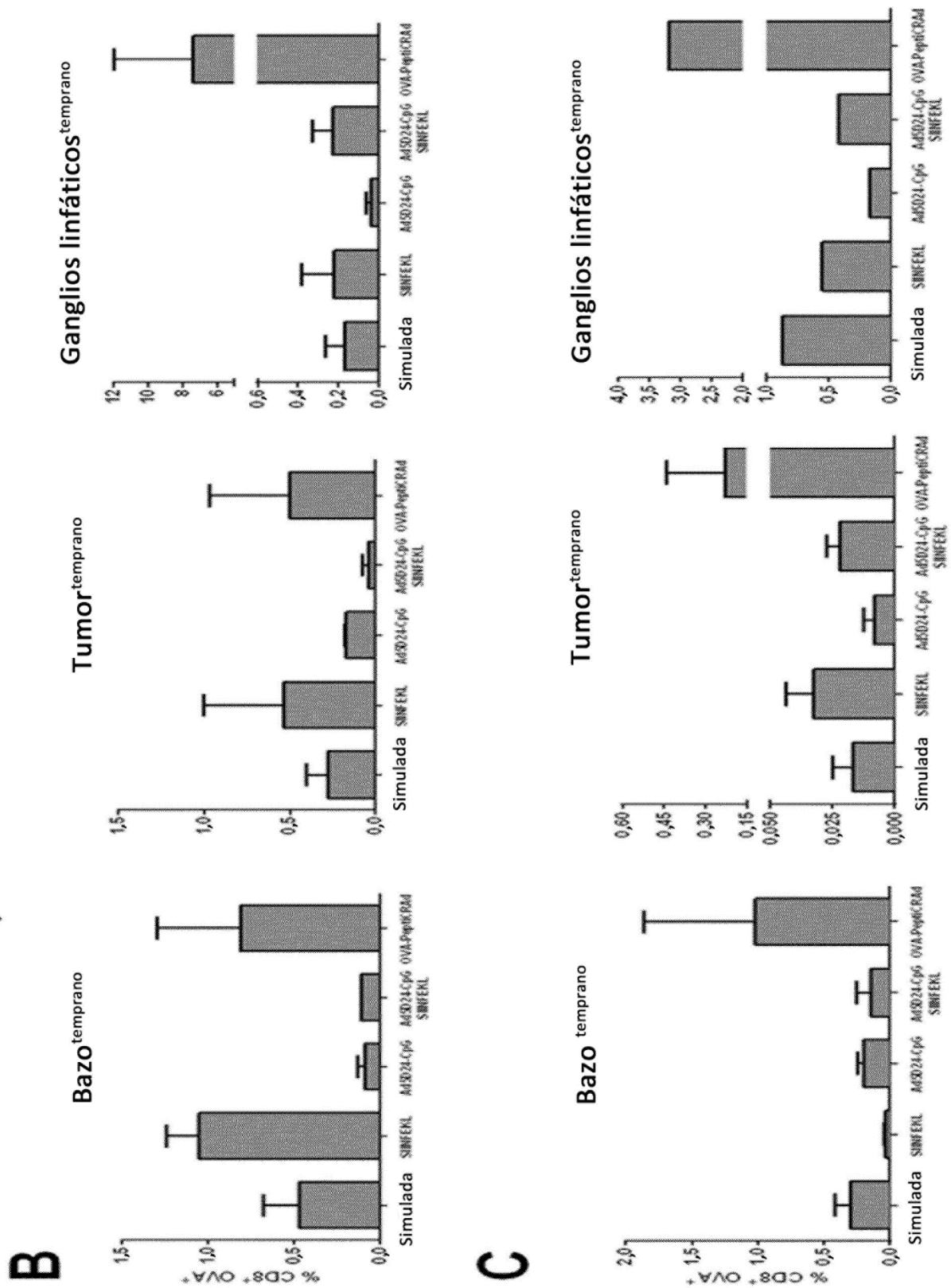


Figura 15E.



Figuras 15B Y C.

**D**

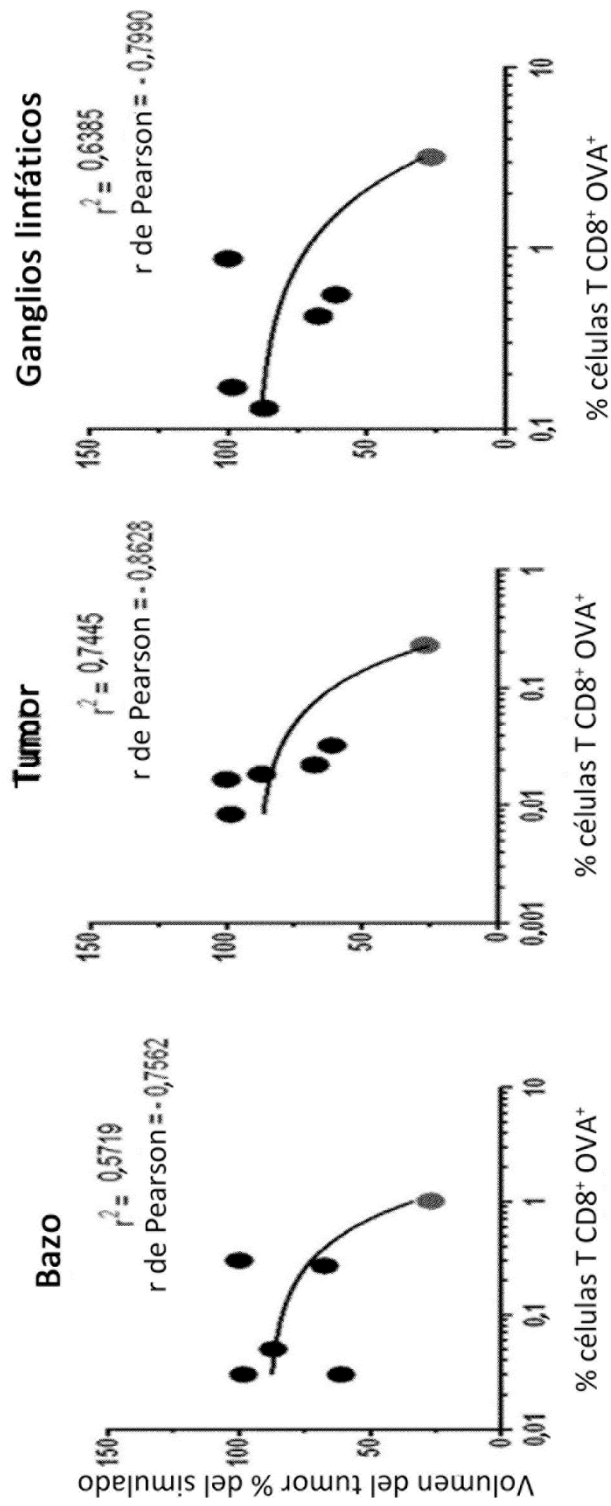


Figura 15D.

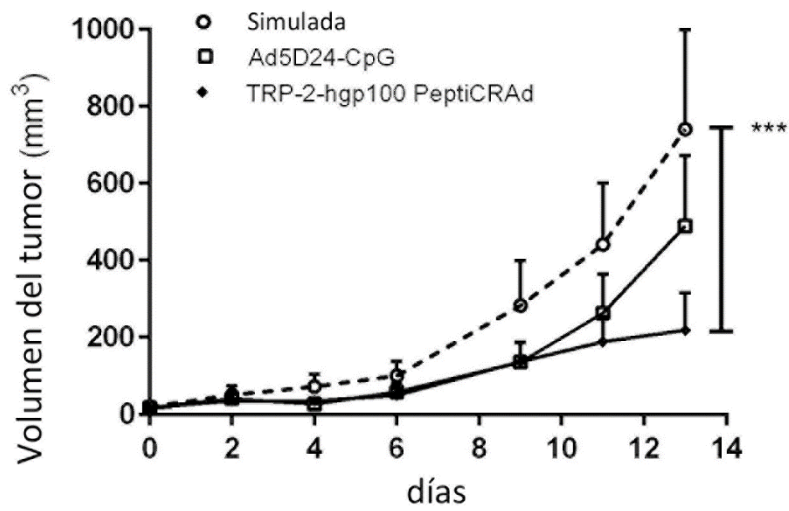


Figura 16A.

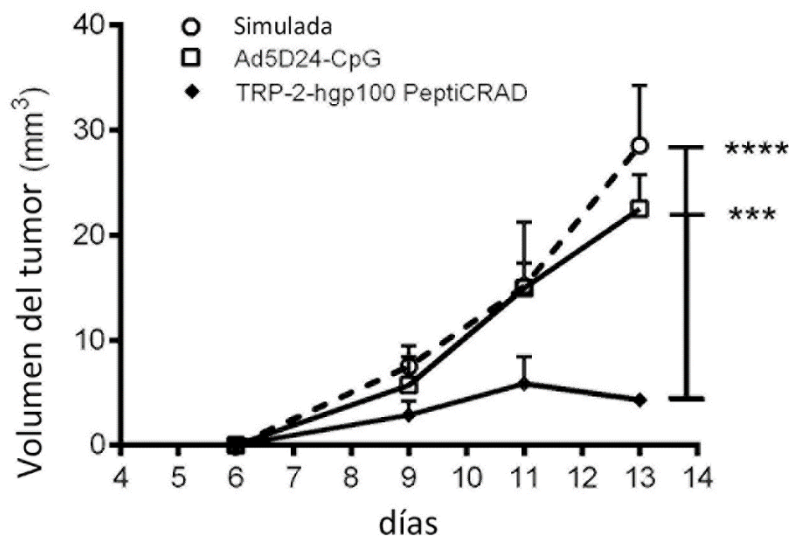


Figura 16B.

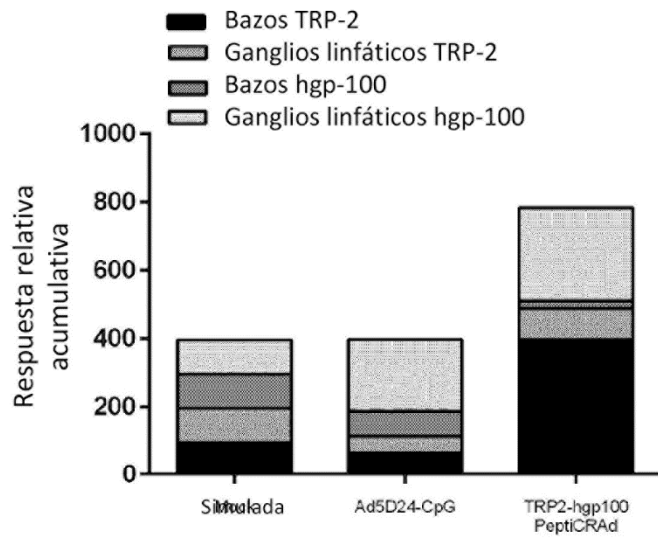
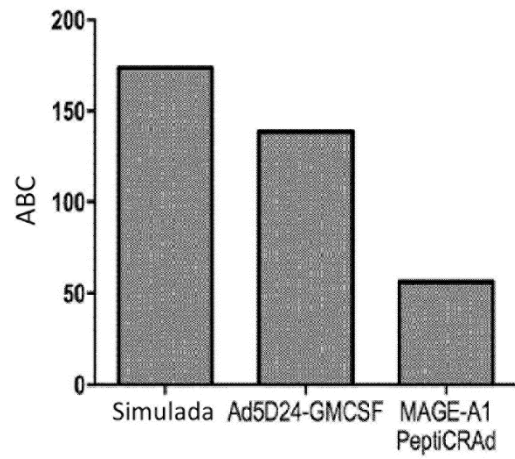
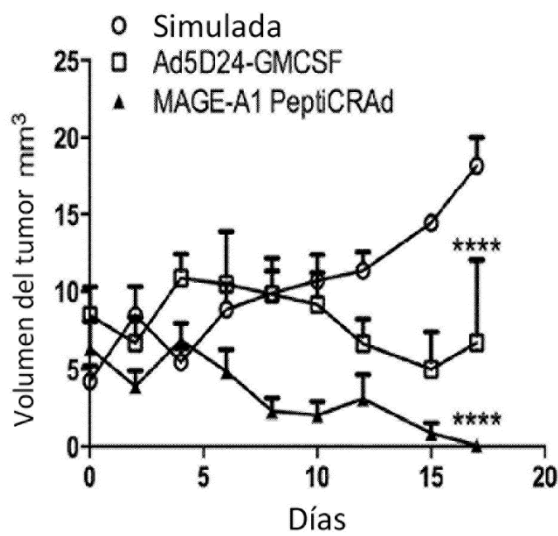


Figura 16C.



FiguraS 17A y B.

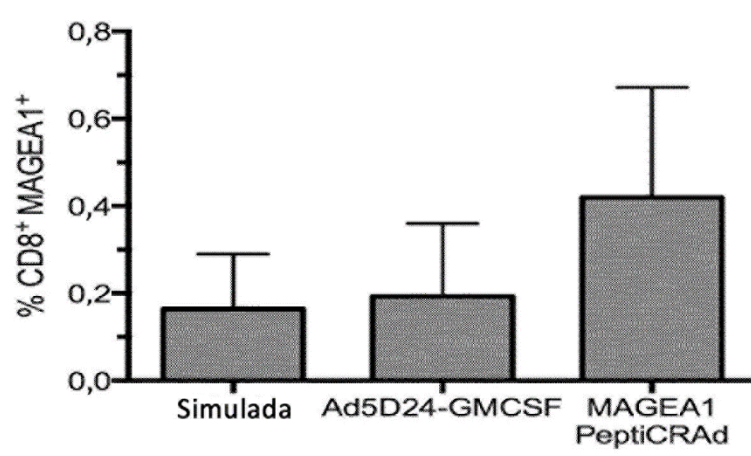


Figura 17C.