

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 873**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/768** (2015.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2015 PCT/EP2015/066263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16008976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2015 E 15738359 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3169341**

54 Título: **Virus oncolítico para la expresión de moduladores de puntos de control inmunitarios**

30 Prioridad:

**16.07.2014 EP 14306153**

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

**21.02.2020**

73 Titular/es:

**TRANSGENE SA (100.0%)  
Parc d'Innovation Boulevard Gonthier  
d'Andernach  
67400 Illkirch Graffenstaden, FR**

72 Inventor/es:

**SILVESTRE, NATHALIE;  
GEIST, MICHEL;  
RITTNER, KAROLA;  
MARCHAND, JEAN-BAPTISTE y  
THIOUDELLET, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

**CURELL SUÑOL, S.L.P.**

Observaciones:

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

**ES 2 743 873 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Virus oncolítico para la expresión de moduladores de puntos de control inmunitarios.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente al campo de la viroterapia oncolítica, y más específicamente a composiciones y métodos para tratar, prevenir o inhibir enfermedades proliferativas, especialmente cáncer. Las formas de realización incluyen un virus oncolítico que comprende secuencia o secuencias nucleotídicas que codifican uno o más moduladores de puntos de control inmunitario, como se define en las reivindicaciones. Las formas de realización asimismo incluyen una composición farmacéutica que comprende tal virus oncolítico y, eventualmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y su utilización para tratar enfermedades proliferativas tales como cánceres, como se define en las reivindicaciones.

El cáncer está causado tanto por factores externos (por ejemplo tabaco, organismos infecciosos, hábitos alimentarios, sustancias químicas, y radiación) como por factores internos (por ejemplo mutaciones heredadas, hormonas, afecciones inmunitarias, y mutaciones que se producen del metabolismo). Cada año, el cáncer se diagnostica en más de 12 millones de sujetos en todo el mundo. En los países industrializados, aproximadamente una persona de cada cinco morirá de cáncer. Aunque existe un gran número de sustancias quimioterápicas, a menudo son ineficaces, especialmente frente a tumores malignos y metastásicos que se establecen en una etapa muy temprana de la enfermedad. Además, la inmunidad antitumoral es a menudo ineficaz debido al hecho de que las células tumorales han desarrollado mecanismos para escapar a la defensa del hospedante. Uno de los mecanismos principales de la supresión inmune es un proceso conocido como "agotamiento de células T", que resulta de la exposición crónica a antígenos y se caracteriza por el aumento de receptores inhibidores. Estos receptores inhibidores sirven como puntos de control inmunitarios a fin de evitar reacciones inmunes incontroladas. En la bibliografía se han descrito diversos puntos de control inmunitarios que actúan a diferentes niveles de la inmunidad de células T, incluyendo la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y sus ligandos PD-L1 y PD-L2, CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos), LAG3, atenuador de linfocitos B y T, inmunoglobulina de células T, proteína 3 que contiene el dominio de mucina (TIM-3), y el supresor inmunoglobulínico del dominio V de la activación de células T.

Cualquiera que sea el mecanismo de acción, estos puntos de control inmunitarios pueden inhibir el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral eficiente. Hay un creciente interés en los posibles beneficios terapéuticos de bloquear tales puntos de control inmunitarios como medio para inhibir la tolerancia del sistema inmune a tumores y rescatar de este modo células T antitumorales agotadas (Leach et al., 1996, Science 271: 1734-6). Durante la última década se ha desarrollado un gran número de anticuerpos antagonistas (por ejemplo anti Tim3, -PD-L1, -CTLA-4, -PD1, etc.), y lo más importante, algunos se han asociado con respuestas clínicas objetivas en pacientes con cáncer. Ya se comercializan anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 (por ejemplo Ipilimumab, Yervoy, Bristol-Myers Squibb) para melanoma metastásico. BMS dio a conocer que, de 1800 pacientes con melanoma tratados con ipilimumab, el 22% todavía están vivos 3 años más tarde. Asimismo están en desarrollo terapias de anticuerpos con PD-L1 (por ejemplo MPDL3280A, Roche), anti PD-1 (por ejemplo Nivolumab, BMS).

Otro enfoque terapéutico que está surgiendo en el campo del cáncer son los virus oncolíticos (Hermiston, 2006, Curr. Opin. Mol. Ther. 8: 322-30). Los virus oncolíticos son capaces de la replicación selectiva en células en división (por ejemplo células cancerosas), mientras dejan inalteradas las células que no se dividen (por ejemplo células normales). A medida que las células en división infectadas son destruidas por lisis, liberan nuevas partículas víricas infecciosas para infectar las células en división circundantes. Las células cancerosas son hospedantes ideales para muchos virus, debido a que tienen inactivada la ruta de interferón antiviral, o tienen genes supresores de tumores mutados que permiten que la replicación vírica transcurra sin impedimentos (Chernajovsky et al., 2006, British Med. J. 332: 170-2). Ahora se han ensayado como agentes oncolíticos un número de virus, incluyendo adenovirus, reovirus, sarampión, herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, y virus vaccinia.

Algunos virus son naturalmente oncolíticos (tales como los reovirus y el picornavirus del Valle de Seneca), mientras que otros son manipulados en busca de la selectividad tumoral modificando el genoma vírico. Tales modificaciones incluyen supresiones funcionales en genes víricos esenciales, el uso de promotores específicos del tumor o del tejido para controlar la expresión del gen vírico, y la modificación del tropismo para redirigir el virus hacia la superficie de la célula cancerosa.

El primer virus oncolítico en ser aprobado por una agencia reguladora fue un adenovirus modificado genéticamente denominado H101 (Shanghai Sunway Biotech), que se ganó el visto bueno en 2005 de la State Food and Drug Administration (SFDA) de China para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello. Otro adenovirus oncolítico, denominado ONYX-015, se encuentra en ensayos clínicos en desarrollo para el tratamiento de diversos tumores sólidos (en fase III para el tratamiento de cáncer recurrente de cabeza y cuello) (Cohen et al., 2001, Curr. Opin. Investig. Drugs 2: 1770-5). Como otro ejemplo, el herpes simple oncolítico 1 (T-VEC) se manipuló mediante ingeniería genética para atenuar la virulencia del virus, incrementar la selectividad por células cancerosas, y potenciar la respuesta inmune antitumoral (a través de la expresión de GM-CSF). La eficacia clínica en melanoma

no extirpable ha sido demostrada en ensayos clínicos de Fase II y Fase III (Senzer et al, 2009, J. Clin. Oncol. 27: 5763-71).

Los virus vaccinia (VV) poseen muchos de los atributos clave necesarios para el uso de viroterapia oncolítica, tal como tropismo natural para tumores, fuerte capacidad lítica, ciclo de vida corto con extensión rápida de célula a célula, expresión génica muy eficiente, y una gran capacidad de clonación. Además, se han administrado a millones de individuos durante la campaña de erradicación de la viruela, sin problemas de seguridad importantes. A este respecto, VV con supresión doble de TK y VGF (cepa de Wyeth), que expresa GM-CSF (denominado JX-963), mostró una selectividad significativa por el cáncer en ratones que poseen tumores (Thorne et al., 2007, J Clin Invest. 117: 3350-8). En la misma línea, JX-594, un VV con TK suprimido (cepa de Wyeth), armado con GM-CSF, ha mostrado datos clínicos prometedores, y se espera que comience pronto un ensayo de Fase III aleatorizado en carcinoma hepatocelular.

Asimismo se han descrito en la bibliografía terapias de combinación que implican un virus oncolítico e inhibidores de los puntos de control inmunitarios. El documento WO2014/022138 describe la combinación de células tumorales irradiadas, un adenovirus oncolítico y un anticuerpo anti-CTLA4, para uso para tratar cáncer de vejiga o de próstata. El documento WO2014/047350 concibe un virus oncolítico recombinante con un gen que codifica un anticuerpo anti-PD-1 insertado en el genoma vírico, sin proporcionar ningún ejemplo de trabajo que pudiera apoyar la utilidad de tal virus oncolítico.

### Problema técnico

Se puede esperar que el cáncer continuará siendo una amenaza grave de salud global durante muchos años debido al gran número de factores etiológicos que pueden actuar juntos o separadamente para iniciar o promover el desarrollo de un cáncer. Además, los tumores malignos, y especialmente metastásicos, son a menudo resistentes a terapias convencionales, lo que explica la morbilidad significativa de algunos cánceres.

De este modo, existe una importante necesidad de desarrollar enfoques más eficaces, para mejorar la prevención y tratamiento de tales enfermedades proliferativas, y especialmente cánceres metastásicos. La presente invención proporciona un producto único que combina la oncolisis para exterminar células en división y el punto de control inmunitario para romper la tolerancia inmunitaria asociada al cáncer.

Este problema técnico se resuelve mediante la provisión de las formas de realización como se definen en las reivindicaciones.

Otros y adicionales aspectos, características y ventajas se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción de las formas de realización o ejemplos preferidos en la presente memoria. Estas formas de realización o ejemplos son proporcionados a título descriptivo.

### Sumario de la presente invención y la presente divulgación

La presente invención se refiere a un virus oncolítico que comprende, insertado en su genoma, una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más moduladores de puntos de control inmunitario, en el que dicho virus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen I4L vírico.

La presente divulgación se refiere más generalmente a un virus oncolítico que comprende, insertado en su genoma, una o más moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios.

El virus oncolítico se selecciona preferentemente del virus que consiste en reovirus, virus de la enfermedad de New Castle (NDV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus del sarampión, virus de la gripe, virus de Sinbis, adenovirus, poxvirus, y virus del herpes (HSV), y similares. El virus oncolítico puede ser un virus vaccinia. Preferentemente, el virus vaccinia se manipula para que carezca de actividad de timidina cinasa (por ejemplo, el genoma de dicho VV tiene una mutación inactivante en el gen J2R para producir un genotipo de TK defectuoso). Como alternativa, o en combinación, el virus vaccinia se manipula para que carezca de actividad de RR (por ejemplo, el genoma de dicho VV tiene una mutación inactivante en el gen I4L y/o F4L para producir un fenotipo de RR defectuoso). En la invención, el virus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen I4L vírico.

En una forma de realización, el virus vaccinia expresa además por lo menos un gen terapéutico, en particular un gen que codifica un producto génico suicida y/o una proteína inmunoestimulante.

En la invención, el uno o más moduladores de punto de control inmunitario codificados son preferentemente una molécula antagonista que antagoniza la actividad de PD-1, PD-L1 PD-L2, LAG3, Tim3, BTLA y CTLA4. En una forma de realización, el uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios codificados son una molécula

antagonista que antagoniza la actividad de PD-1, PD-L1 o CTLA4, con una preferencia específica por un anticuerpo anti PD-1 y/o un anticuerpo CTLA4.

5 La presente invención y divulgación proporcionan además una composición que comprende dicho virus oncolítico, eventualmente con un vehículo farmacéutico aceptable. En una forma de realización, la composición se formula para administración intravenosa o intratumoral.

10 La presente divulgación asimismo se refiere al uso de dicho virus oncolítico, o composición del mismo, para tratar una enfermedad proliferativa, así como a un método de tratamiento que se basa en la administración de una cantidad eficaz de dicho virus oncolítico o composición del mismo. Por ejemplo, la enfermedad proliferativa tratada mediante el método de la invención es cáncer, y especialmente melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de hígado. Por ejemplo, el uso o método comprende una etapa adicional en la que se administra a dicho mamífero una cantidad farmacéuticamente aceptable de un profármaco. La administración de dicho profármaco tiene lugar preferentemente por lo menos 3 días tras la administración de dicho virus oncolítico o composición de virus.

15 La presente invención asimismo se refiere a un virus oncolítico o a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho virus oncolítico y un vehículo farmacéutico aceptable, para uso para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, preferentemente un cáncer, y más preferentemente un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de hígado, en el que dicho virus oncolítico comprende, insertado en su genoma, una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más moduladores de puntos de control inmunitario, en el que dicho virus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen I4L vírico.

25

### Descripción detallada

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

30 La presente divulgación se refiere más generalmente a un virus oncolítico que comprende, insertado en su genoma, una o más moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios.

### Definiciones

35 Como se usan en la presente memoria, los términos “un” y “una” se usan en el sentido de que significan “por lo menos un”, “por lo menos un primer”, “uno o más” o “una pluralidad” de los componentes o etapas citados, excepto que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión “una célula” incluye una pluralidad de células, incluyendo mezclas de las mismas.

40 La expresión “uno o más” se refiere a uno o a un número por encima de uno (por ejemplo 2, 3, 4, 5, etc.).

El término “y/o”, donde quiera que se use en la presente memoria, incluye el significado de “y”, “o” y “todas y cada una de las combinaciones de los elementos conectados mediante dicho término”.

45 La expresión “alrededor de” o “aproximadamente”, como se usa en la presente memoria, significa dentro de 20%, preferentemente dentro de 10%, y más preferentemente dentro de 5% de un valor o intervalo dado.

50 Como se usa en la presente memoria, cuando se use para definir productos, composiciones y métodos, la expresión “que comprende” (y cualquier forma de “que comprende”, tal como “comprender” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de “que tiene”, tal como “tener” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de “que incluye”, tal como “incluir” y “incluye”) o “que contiene” (y cualquier forma de “que contiene”, tal como “contener” y “contiene”) es de extremo abierto, y no excluye elementos o etapas del método no citados, adicionales. De este modo, un polipéptido “comprende” una secuencia de aminoácidos cuando la secuencia de aminoácidos puede ser parte de la secuencia de aminoácidos final del polipéptido. Tal polipéptido puede tener hasta varios centenares de restos de aminoácidos adicionales. “Que consiste esencialmente en” significa que excluye otros componentes o etapas de cualquier significancia esencial. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los componentes citados excluiría contaminantes en trazas y portadores farmacéuticamente aceptables. Un polipéptido “consiste esencialmente en” una secuencia de aminoácidos cuando tal secuencia de aminoácidos está presente con eventualmente solo unos pocos restos de aminoácidos adicionales. “Que consiste en” significa que excluye más que elementos en trazas de otros componentes o etapas. Por ejemplo, un polipéptido “consiste en” una secuencia de aminoácidos cuando el polipéptido no contiene ningún aminoácido salvo la secuencia de aminoácidos citada.

65 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se refieren a polímeros de restos de aminoácidos que comprenden por lo menos nueve o más aminoácidos enlazados vía enlaces peptídicos. El polímero puede ser lineal, ramificado o cíclico, y puede comprender aminoácidos de origen natural y/o análogos de aminoácidos, y puede estar

interrumpido por no aminoácidos. Como indicación general, si el polímero de aminoácidos tiene más de 50 restos de aminoácidos, preferentemente se denomina como un polipéptido o una proteína, mientras que si tiene 50 aminoácidos de longitud o menos, se denomina como “péptido”.

5 Dentro del contexto de la presente divulgación, las expresiones “ácido nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “polinucleótido” y “secuencia nucleotídica” se usan de forma intercambiable, y definen un polímero de cualquier longitud de polidesoxirribonucleótidos (ADN) (por ejemplo ADNc, ADN genómico, plásmidos, vectores, genomas víricos, ADN aislado, sondas, cebadores, y cualquier mezcla de los mismos) o polirribonucleótidos (ARN) (por ejemplo ARNm, ARN antisentido, ARNip), o polirribo-polidesoxirribonucleótidos mixtos. Comprenden polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios, lineales o circulares, naturales o sintéticos, modificados o no modificados. Además, un polinucleótido puede comprender nucleótidos de origen no natural, y puede estar interrumpido por componentes no nucleotídicos.

15 El término “análogo” o “variante”, como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula (polipéptido o ácido nucleico) que exhibe una o más modificaciones con respecto a la contraparte nativa. Se puede concebir cualquier modificación o modificaciones, incluyendo sustitución, inserción y/o supresión de uno o más restos nucleotídicos/de aminoácidos. Se prefieren los análogos que retienen un grado de identidad de secuencia de por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 85%, más preferentemente por lo menos 90%, e incluso más preferentemente por lo menos 98% de identidad con la secuencia de la contraparte nativa.

20 De manera general, el término “identidad” se refiere a una correspondencia de aminoácido con aminoácido o de nucleótido con nucleótido entre dos secuencias polipeptídicas o de ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios vacíos que puede ser necesario introducir para el alineamiento óptimo, y la longitud de cada espacio vacío. En la técnica hay diversos programas de ordenador y algoritmos matemáticos para determinar el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos, tales como, por ejemplo, el programa Blast, disponible en NCBI, o ALIGN en Atlas of Protein Sequence and Structure (Dayhoffed, 1981, Supl., 3:482-9). Asimismo se encuentran disponibles en bases de datos especializadas programas para determinar la identidad entre secuencias nucleotídicas (por ejemplo Genbank, el Wisconsin Sequence Analysis Package, los programas BESTFIT, FASTA y GAP). A título ilustrativo, “por lo menos 80% de identidad” significa 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

35 Como se usa en la presente memoria, el término “aislado” se refiere a una proteína, polipéptido, péptido, polinucleótido, vector, etc., que se retira de su entorno natural (es decir, se separa de por lo menos algún otro componente o componentes con el que está asociado de forma natural o se encuentra en la naturaleza). Por ejemplo, una secuencia nucleotídica está aislada cuando se separa de secuencias asociadas normalmente con ella en la naturaleza (por ejemplo, disociada de un genoma), pero puede estar asociada con secuencias heterólogas.

40 La expresión “obtenido de”, “que se origina de” o “originar” se usa para identificar la fuente original de un componente (por ejemplo polipéptido, molécula de ácido nucleico), pero no pretende limitar el método mediante el cual se obtiene el componente, que puede ser, por ejemplo, mediante síntesis química o por medios recombinantes.

45 Como se usa en la presente memoria, la expresión “célula hospedante” debería entenderse ampliamente sin ninguna limitación con respecto a la organización particular en células de tejidos, de órganos, o aisladas. Tales células pueden ser de un tipo único de células, o un grupo de diferentes tipos de células, tales como estirpes celulares cultivadas, células primarias y células en división. En el contexto de la divulgación, la expresión “células hospedantes” incluye células procariotas, células eucariotas inferiores, tales como levadura, y otras células eucariotas, tales como células de insectos, células vegetales y de mamíferos (por ejemplo humanos y no humanos), así como células capaces de producir el virus oncolítico y/o el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios para uso en la presente memoria. Esta expresión asimismo incluye células que pueden ser o han sido receptoras de los vectores descritos en la presente memoria, así como progenie de tales células.

55 Como se usa en la presente memoria, la expresión “virus oncolítico” se refiere a un virus capaz de replicarse selectivamente en células en división (por ejemplo una célula proliferativa tal como una célula cancerosa) con la ayuda de la ralentización del crecimiento y/o la lisis de dicha célula en división, ya sea in vitro o in vivo, a la vez que no muestra replicación, o muestra replicación mínima, en células que no se dividen. Típicamente, un virus oncolítico contiene un genoma vírico empaquetado en una partícula vírica (o virión), y es infeccioso (es decir, es capaz de infectar y entrar en una célula hospedante o sujeto). Como se usa en la presente memoria, esta expresión comprende vector de ADN o de ARN (dependiendo del virus en cuestión), así como partículas víricas generadas a partir del mismo.

65 El término “tratamiento” (y cualquier forma de tratamiento, tal como “que trata”, “tratar”), como se usa en la presente memoria, comprende la profilaxis (por ejemplo, medida preventiva en un sujeto con riesgo de tener la patología a tratar) y/o la terapia (por ejemplo, en un sujeto diagnosticado por tener la patología), eventualmente en asociación

con modalidades terapéuticas convencionales. El resultado del tratamiento es la ralentización, cura, mejora o control de la progresión de la patología diana. Por ejemplo, un sujeto es tratado con éxito para un cáncer si, tras la administración de un virus oncolítico como se describe en la presente memoria, el sujeto muestra una mejora observable de su estado clínico.

5

El término “administrando” (o cualquier forma de administración, tal como “administrado”), como se usa en la presente memoria, se refiere al suministro a un sujeto de un agente terapéutico tal como el virus oncolítico descrito en la presente memoria.

10

Como se usa en la presente memoria, la expresión “enfermedad proliferativa” comprende cualquier enfermedad o afección que resulte del crecimiento y diseminación celulares incontrolados, incluyendo cánceres así como enfermedades asociadas con una mayor actividad de osteoclastos (por ejemplo artritis reumatoide, osteoporosis, etc.) y enfermedades cardiovasculares (restenosis que resulta de la proliferación de células del músculo liso de la pared de vasos sanguíneos, etc.). El término “cáncer” se puede usar de forma intercambiable con cualquiera de los términos “tumor”, “malignidad”, “neoplasia”, etc. Estos términos pretenden incluir cualquier tipo de tejido, órgano o célula, cualquier etapa de neoplasia (por ejemplo, de una lesión previa a la etapa IV)

15

20

El término “sujeto” se refiere generalmente a un organismo para el cual se necesita o puede ser beneficioso cualquier producto y método descritos en la presente memoria. Típicamente, el organismo es un mamífero, particularmente un mamífero seleccionado de entre el grupo que consiste en animales domésticos, animales de granjas, animales deportivos, y primates. Preferentemente, el sujeto es un ser humano que ha sido diagnosticado por tener o estar en riesgo de tener una enfermedad proliferativa tal como cáncer. Los términos “sujeto” y “pacientes” se pueden usar de forma intercambiable cuando se refieren a un organismo humano, y comprenden hombres y mujeres. El sujeto que se debe tratar puede ser un neonato, un lactante, un adulto joven o un adulto.

25

30

El término “combinación” o “asociación”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier disposición posible de diversos componentes (por ejemplo, un virus oncolítico y una o más sustancias eficaces en la terapia contra el cáncer). Tal disposición incluye la mezcla de dichos componentes, así como combinaciones separadas para administraciones concomitantes o secuenciales. La presente divulgación comprende combinaciones que comprenden concentraciones molares iguales de cada componente, así como combinaciones con concentraciones muy diferentes. Se aprecia que la concentración óptima de cada componente de la combinación puede ser determinada por el experto en la materia.

35

40

45

La expresión “modulador de puntos de control inmunitario” se refiere a una molécula capaz de modular la función de una proteína de puntos de control inmunitarios de una forma positiva o negativa (en particular la interacción entre una célula presentadora de antígeno (APC) o una célula cancerosa y una célula efectora T). La expresión “punto de control inmunitario” se refiere a una proteína implicada directa o indirectamente en una ruta inmune que, en condiciones fisiológicas normales, es crucial para prevenir reacciones inmunes incontroladas y, de este modo, para el mantenimiento de la autotolerancia y/o protección tisular. El uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios en uso en la presente memoria pueden actuar independientemente en cualquier etapa de la inmunidad mediada por células T, incluyendo la selección clonal de células específicas de antígenos, la activación de células T, la proliferación, el tráfico a sitios de antígeno e inflamación, la ejecución de la función efectora directa y la señalización a través de citocinas y ligandos de membrana. Cada una de estas etapas está regulada por señales estimulantes e inhibitoras que se contrarrestan que al final afinan la respuesta. En el contexto de la presente invención y divulgación, la expresión comprende modulador o moduladores de punto de control inmunitario capaces de disminuir por lo menos parcialmente la función de un punto de control inmunitario inhibitor (antagonista), y/o modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios capaces de aumentar por lo menos parcialmente la función de un punto de control inmunitario estimulante (agonista).

50

#### Virus oncolítico

55

60

El virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener de cualquier miembro de virus identificado actualmente, con la condición de que sea oncolítico por su tendencia a replicarse selectivamente y exterminar células en división en comparación con células que no se dividen. Puede ser un virus nativo que sea oncolítico de forma natural, o se puede manipular modificando uno o más genes víricos para incrementar la selectividad por el tumor y/o la replicación preferente en células que se dividen, tales como los implicados en la replicación del ADN, el metabolismo del ácido nucleico, el tropismo del hospedante, la adhesión superficial, la lisis, la virulencia, la lisis y la diseminación (véanse, por ejemplo, Kim et al., 2001, Nat. Med. 7: 781; Wong et al., 2010, Viruses 2: 78-106). Asimismo se puede concebir la puesta de uno o más genes víricos bajo el control de elementos reguladores específicos de sucesos o de tejidos (por ejemplo, promotor).

65

Los virus oncolíticos ejemplificativos incluyen, sin limitación, reovirus, virus del Valle de Seneca (SVV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la enfermedad de New Castle (NDV), virus del herpes simple (HSV), virus morbillivirus, retrovirus, virus de la gripe, virus de Sinbis, poxvirus, adenovirus, o similar.

Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener a partir de un reovirus. Un ejemplo representativo incluye reolisina (bajo desarrollo por Oncolytics Biotech; NCT01166542).

5 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener a partir de un virus del Valle de Seneca. Un ejemplo representativo incluye NTX-010 (Rudin et al., 2011, Clin. Cancer. Res. 17(4): 888-95).

10 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener de un virus de la estomatitis vesicular (VSV). Los ejemplos representativos se describen en la bibliografía (por ejemplo, Stojdl et al., 2000, Nat. Med. 6(7): 821-5; Stojdl et al., 2003, Cancer Cell 4(4): 263-75).

15 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener a partir de un virus de la enfermedad de Newcastle. Los ejemplos representativos incluyen, sin limitación, las cepas 73-T PV701 y HDV-HUJ, así como las descritas en la bibliografía (por ejemplo, Phuangsab et al., 2001, Cancer Lett. 172(1): 27-36; Lorence et al., 2007, Curr. Cancer Drug Targets 7(2): 157-67; Freeman et al., 2006, Mol. Ther. 13(1): 221-8).

20 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener a partir de un virus del herpes. Los Herpesviridae son una gran familia de virus de AND que comparten todos ellos una estructura común y están compuestos de genomas de ADN lineal bicatenario relativamente grande que codifican 100-200 genes encapsidados en una cápside icosaédrica que está envuelta en una membrana de bicapa lipídica. Aunque el virus el herpes oncolítico puede derivar de diferentes tipos de HSV, se prefieren particularmente HSV1 y HSV2. El virus del herpes se puede modificar genéticamente para restringir la replicación vírica en tumores, o reducir su citotoxicidad en células que no se dividen. Por ejemplo, se puede inactivar cualquier gen vírico implicado en el metabolismo del ácido nucleico, tal como timidina cinasa (Martuza et al., 1991, Science 252: 854-6), ribonucleótido reductasa (RR) (Boviatsis et al., Gene Ther. 1: 323-31; Mineta et al., 1994, Cancer Res. 54: 3363-66), o uracilo-N-glicosilasa (Pyles et al., 1994, J. Virol. 68: 4963-72). Otro aspecto implica mutantes víricos con defectos en la función de genes que codifican factores de virulencia, tal como el gen ICP34.5 (Chambers et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1411-5). Los ejemplos representativos de virus del herpes oncolítico incluyen NV1020 (por ejemplo Geevarghese et al., 2010, Hum. Gene Ther. 21(9): 1119-28) y T-VEC (Andtbacka et al., 2013, J. Clin. Oncol. 31, número de resumen LBA9008).

30 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener de un morbillivirus, que se puede obtener de la familia de paramyxoviridae, con preferencia específica por el virus del sarampión. Los ejemplos representativos del virus del sarampión oncolíticos incluyen, sin limitación, MV-Edm (McDonald et al., 2006; Breast Cancer Treat. 99(2): 177-84) y HMWMAA (Kaufmann et al., 2013, J. Invest. Dermatol. 133(4): 1034-42)

35 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación se puede obtener de un adenovirus. En la técnica existen métodos para manipular los adenovirus oncolíticos. Una estrategia ventajosa incluye la sustitución de promotores víricos por promotores selectivos del tumor, o modificaciones del producto o productos génicos adenovíricos E1 para inactivar su función de unión con p53 o con la proteína del retinoblastoma (Rb), que está alterada en células tumorales. En el contexto natural, el gen E1B55kDa adenovírico coopera con otro producto adenovírico para inactivar p53 (p53 está frecuentemente desregulada en células cancerosas), previniendo así la apoptosis. Los ejemplos representativos de adenovirus oncolítico incluyen ONYX-015 (por ejemplo Khuri et al., 2000, Nat. Med 6(8): 879-85) y H101, asimismo denominado Oncorine (Xia et al., 2004, Ai Zheng 23(12): 1666-70).

45 Por ejemplo, el virus oncolítico de la presente divulgación puede ser un poxvirus. Como se usa en la presente memoria, el término "poxvirus" se refiere a un virus que pertenece a la familia Poxviridae, con preferencia específica por un poxvirus que pertenece a la subfamilia Chordopoxviridae, y más preferentemente al género Orthopoxvirus. Las secuencias del genoma de diversos poxvirus, por ejemplo los genomas del virus vaccinia, del virus de la viruela del ganado, del virus de la viruela del canario, del virus de la ectromelia, y del virus del mixoma, están disponibles en la técnica y en bases de datos especializadas tales como Genbank (números de acceso NC\_006998, NC\_003663, NC\_005309, NC\_004105, NC\_001132, respectivamente).

50 De forma deseable, el poxvirus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico. En la invención, el poxvirus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen I4L vírico. Los virus vaccinia son miembros de la familia de poxvirus caracterizados por un genoma de ADN bicatenario de 200 kb que codifica numerosas enzimas víricas y factores que permiten que el virus se replique independientemente de la maquinaria celular del hospedante. La mayoría de las partículas del virus vaccinia es intracelular (IMV para virión maduro intracelular), con una única cubierta lipídica, y permanece en el citosol de células infectadas hasta la lisis. La otra forma infecciosa es una partícula de doble cubierta (EEV para virión cubierto extracelular) que brota de la célula infectada sin lisarla.

60 Aunque puede derivar de cualquier cepa del virus vaccinia, se prefieren particularmente las cepas Elstree, Wyeth, Copenhagen y Western Reserve. La nomenclatura génica usada en la presente memoria es la de la cepa del virus vaccinia de Copenhagen. Asimismo se usa en la presente memoria para los genes homólogos de otros poxviridae, excepto que se indique de otro modo. Sin embargo, la nomenclatura génica puede ser diferente según la cepa del

65

poxvirus, pero la correspondencia entre las cepas del virus vaccinia de Copenhague y otras cepas del virus vaccinia está generalmente disponible en la bibliografía.

5 Preferentemente, el virus vaccinia oncolítico de la presente invención y divulgación se modifica alterando uno o más genes víricos. Dicha modificación o modificaciones conducen preferentemente a la síntesis de una proteína defectuosa incapaz de asegurar la actividad de la proteína producida en condiciones normales por el gen no modificado (o falta de síntesis). Las modificaciones comprenden la supresión, la mutación y/o la sustitución de uno o más nucleótidos (contiguos o no) en el gen vírico o sus elementos reguladores. La modificación o modificaciones se pueden realizar de muchas maneras conocidas por los expertos en la materia, usando técnicas recombinantes convencionales. Las modificaciones ejemplificativas se describen en la bibliografía, con preferencia específica por aquellas que alteran genes víricos implicados en el metabolismo del ADN, la virulencia del hospedante, la ruta de IFN (véase, por ejemplo, Guse et al., 2011, Expert Opinion Biol. Ther. 11(5): 595-608), y similares.

15 Más preferentemente, el poxvirus oncolítico de la presente invención y divulgación se modifica alterando el gen que codifica timidina cinasa (locus J2R). La enzima TK está implicada en la síntesis de desoxirribonucleótidos. TK es necesaria para la replicación vírica en células normales, ya que estas células tienen una concentración generalmente baja de nucleótidos, mientras que es indispensable en células que se dividen, que contienen una concentración elevada de nucleótidos.

20 Como alternativa, o en combinación, el poxvirus oncolítico de la presente divulgación se modifica alterando por lo menos un gen, o ambos genes, que codifican ribonucleótido reductasa (RR). En el contexto natural, esta enzima cataliza la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, que representa una etapa crucial en la biosíntesis del ADN. La enzima vírica es similar en estructura de la subunidad a la de la enzima de mamífero, estando compuesta de dos subunidades heterólogas, designadas R1 y R2, codificadas respectivamente por el locus I4L y F4L. Las secuencias para los genes I4L y F4L, y sus localizaciones en el genoma de diversos poxvirus, están disponibles en bases de datos públicas, por ejemplo vía número de acceso DQ437594, DQ437593, DQ377804, AH015635, AY313847, AY313848, NC\_003391, NC\_003389, NC\_003310, M-35027, AY243312, DQ011157, DQ011156, DQ011155, DQ011154, DQ011153, Y16780, X71982, AF438165, U60315, AF410153, AF380138, U86916, L22579, NC\_006998, DQ121394 y NC\_008291. En el contexto de la divulgación, se puede inactivar tanto el gen I4L (que codifica la subunidad grande R1) como el gen F4L (que codifica la subunidad pequeña R2), o ambos. Por ejemplo, Gammon et al. (2010, PLOS Pathogens. 6(7)) describen cepas mutantes del virus vaccinia a las que se les ha suprimido el gen I4L y/o el gen F4L. En la invención, el virus vaccinia oncolítico es defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR), que resulta de mutaciones inactivantes en el genoma I4L vírico.

35 Como alternativa, o en combinación, asimismo se pueden llevar adelante otras estrategias para incrementar adicionalmente la especificidad tumoral del virus. Un ejemplo representativo de modificación adecuada incluye la alteración del gen que codifica VGF del genoma vírico. VGF (para factor de crecimiento VV) es una proteína segregada que se expresa tempranamente tras la infección celular, y su función parece importante para la diseminación del virus en células normales. Otro ejemplo es la alteración del gen A56R que codifica hemaglutinina, eventualmente en combinación con la supresión de TK (Zhang et al., 2007, Cancer Res. 67: 10038-46). Asimismo puede ser ventajosa la alteración del gen o genes que modulan el interferón (por ejemplo, el gen B8R o B18R), o el gen B13R inhibidor de caspasa-1. Otra modificación adecuada comprende la alteración del gen F2L, que codifica la dUTPasa vírica implicada tanto en mantener la fidelidad de la replicación del ADN como en proporcionar el precursor para la producción de TMP mediante timidilato sintasa (Broyles et al., 1993, Virol. 195: 863-5). La secuencia del gen F2L del virus vaccinia está disponible en Genbank vía el número de acceso M25392.

50 Preferentemente, el virus oncolítico de esta invención y divulgación es un virus vaccinia defectuoso para TK que resulta de mutaciones inactivantes en el gen J2R. Preferentemente, el virus oncolítico de esta invención y divulgación es un virus vaccinia defectuoso para las actividades tanto de TK como de RR que resulta de mutaciones inactivantes tanto en el gen J2R como en el gen o genes I4L y/o F4L portados por el genoma vírico (por ejemplo como se describe en el documento WO2009/065546 y en Foloppe et al., 2008, Gene Ther., 15: 1361-71), en el que, en la invención, el virus vaccinia oncolítico es defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen I4L vírico. Preferentemente, el virus oncolítico de esta invención y divulgación es un virus vaccinia defectuoso para dUTPasa que resulta de mutaciones inactivantes en el gen F2L (por ejemplo como se describe en el documento WO2009/065547), eventualmente en combinación con la alteración de por lo menos una de las actividades de TK y RR, o de ambas (dando como resultado un virus con mutaciones inactivantes en el gen F2L; F2L y J2R; F2L e I4L; o F2L, J2R y I4L).

#### 60 Genes terapéuticos

65 En un ejemplo, el virus oncolítico de esta invención y divulgación expresan además por lo menos un gen terapéutico insertado en el genoma vírico. Un "gen terapéutico" codifica un producto capaz de proporcionar una actividad biológica cuando se administra apropiadamente a un sujeto, que se espera que provoque un efecto beneficioso sobre el curso o sobre un síntoma de una patología a tratar, ya sea potenciando la eficacia antitumoral o reforzando la naturaleza oncolítica del virus. En el contexto de la invención y divulgación, el gen terapéutico puede ser de

origen mamífero (por ejemplo humano, murino, conejo, etc.), o no (por ejemplo de origen bacteriano, levadura, o vírico).

5 En el contexto de la invención y divulgación, se puede concebir un gran número de genes terapéuticos, tales como aquellos que codifican polipéptidos que pueden compensar en el sujeto proteínas defectuosas o deficientes, o aquellos que actúan a través de efectos tóxicos para limitar o eliminar del cuerpo células dañinas, o aquellos que codifican polipéptidos que confieren inmunidad. Pueden ser genes nativos, o genes obtenidos de estos últimos mediante mutación, supresión, sustitución y/o adición de uno o más nucleótidos.

10 Ventajosamente, el virus oncolítico de la presente invención y divulgación es portador de un gen terapéutico seleccionado de entre el grupo que consiste en genes que codifican productos génicos suicidas y proteínas inmunoestimulantes.

Gen suicida

15 La expresión "gen suicida" se refiere a un gen que codifica una proteína capaz de convertir un precursor de un fármaco en un compuesto citotóxico. Los genes suicidas comprenden, pero no se limitan a, genes que codifican proteína que tiene una actividad de citosina desaminasa, una actividad de timidina cinasa, una actividad de uracilo fosforribosil transferasa, una actividad de purina nucleósido fosforilasa, y una actividad de timidilato cinasa. En la  
20 siguiente tabla se describen ejemplos de genes suicidas y precursores correspondientes de un fármaco que comprenden un resto de nucleobase.

Tabla 1

Gen suicida	Profármaco
Timidina cinasa	Ganciclovir; Éster del ácido elaidico de ganciclovir; penciclovir; Aciclovir; Valaciclovir; (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina; zidovudina; 2'-Exo-metanocarbamidina
Citosina deaminasa	5-Fluorocitosina
Purina nucleósido fosforilasa	6-Metilpurina desoxirribósido; Fludarabina
Uracilo fosforribosil transferasa	5-Fluorocitosina; 5-Fluorouracilo
Timidilato cinasa.	Azidotimidina

25 De forma deseable, el gen suicida codifica una proteína que tiene por lo menos actividad de CDasa. En las procariontas y en eucariotas inferiores (si no están presentes en mamíferos), CDasa está implicada en la ruta metabólica de pirimidina, mediante la cual la citosina exógena se transforma en uracilo por medio de una desaminación hidrolítica. La CDasa asimismo desamina un análogo de citosina, es decir, 4-fluorocitosina (5-FC), formando de ese modo 5-fluorouracilo (5-FU), un compuesto que es muy citotóxico cuando se convierte en 5-fluoro-UMP (5-FUMP). La molécula de ácido nucleico que codifica CDasa se puede obtener de cualquier procarionta y eucariota inferior, tal como *Saccharomyces cerevisiae* (gen FCY1), *Candida Albicans* (gen FCA1) y *Escherichia coli* (gen codA). Las secuencias génicas y las proteínas de CDasa codificadas se han publicado y están disponibles en bancos de datos especializados (SWISSPROT EMBL, Genbank, Medline y similares). Asimismo se pueden  
30 usar análogos funcionales de estos genes. Tales análogos tienen preferentemente una secuencia de ácido nucleico que tiene un grado de identidad de por lo menos 70%, ventajosamente de por lo menos 80%, preferentemente de por lo menos 90%, y lo más preferible de por lo menos 95% con la secuencia de ácido nucleico del gen nativo.

40 Como alternativa o en combinación, el virus oncolítico de la invención y divulgación porta en su genoma vírico un gen suicida que codifica un polipéptido que tiene actividad de uracilo fosforribosil transferasa (UPRTasa). En procariontas y en eucariotas inferiores, el uracilo es transformado en UMP mediante la acción de UPRTasa. Esta enzima convierte 5-FU en 5-FUMP. A título ilustrativo, en el contexto de la invención y divulgación, se pueden usar las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las UPRTasas de *E. coli* (Andersen et al., 1992, European J. Biochem. 204: 51-56), de *Lactococcus lactis* (Martinussen et al., 1994, J. Bacteriol. 176: 6457-63), de *Mycobacterium bovis* (Kim et al., 1997, Biochem. Mol. Biol. Internat. 41: 1117-24) y de *Bacillus subtilis* (Martinussen et al., 1995, J. Bacteriol. 177: 271-4). Sin embargo, se prefiere muy particularmente el uso de una UPRTasa de levadura, y en particular la codificada por *S. cerevisiae* (gen FUR1) cuya secuencia se describe en Kern et al. (1990, Gene 88: 149-57). Asimismo se pueden usar análogos de UPRTasa funcionales, tales como el mutante de  
50 FUR1 truncado N-terminalmente descrito en el documento EP998568 (con una supresión de los 35 primeros restos hasta el segundo resto de Met presente en la posición 36 en la proteína nativa), que exhibe una actividad de UPRTasa mayor que la de la enzima nativa.

55 Preferentemente, el gen suicida insertado en el genoma vírico del virus oncolítico de la presente invención y divulgación codifica un polipéptido que tiene actividades de CDasa y UPRTasa. Tal polipéptido se puede manipular mediante fusión de dos dominios enzimáticos, uno que tiene la actividad de CDasa y el segundo que tiene la

actividad de UPRTasa. Los polipéptidos ejemplificativos incluyen, sin limitación, los polipéptidos de fusión codA::upp, FCY1::FUR1 y FCY1::FUR1[Delta] 105 (FCU1) y FCU1-8 descritos en los documentos WO96/16183, EP998568 y WO2005/07857. Es de particular interés el gen suicida FCU1 (o fusión FCY1::FUR1[Delta] 105) que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada en el identificador de secuencia SEQ ID NO: 1 del documento WO2009/065546. La presente invención y divulgación comprende análogos de tales polipéptidos, con la condición de que retengan las actividades de CDasa y/o de UPRTasa. Está dentro del conocimiento del experto en la materia el aislar las moléculas de ácido nucleico que codifican CDasa y/o UPRTasa a partir de los datos publicados, eventualmente manipular sus análogos, y estudiar la actividad enzimática en un sistema acelular o celular según técnicas convencionales (véase, por ejemplo, el documento EP998568).

#### Genes terapéuticos inmunoestimulantes

Como se usa en la presente memoria, la expresión "proteína inmunoestimulante" se refiere a una proteína que tiene la capacidad para estimular el sistema inmune, de forma específica o no específica. En la técnica se conoce un gran número de proteínas que tienen capacidad para ejercer un efecto inmunoestimulante. Los ejemplos de proteínas inmunoestimulantes adecuadas en el contexto de la invención y divulgación incluyen, sin limitación, citocinas, con preferencia específica por interleucinas (por ejemplo IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-24), quimiocinas (por ejemplo CXCL10, CXCL9, CXCL11), interferones (por ejemplo IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ ), factor de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias (por ejemplo GM-CSF, C-CSF, M-CSF...), proteínas expuestas a APC (por célula presentadora de antígeno) (por ejemplo B7.1, B7.2, y similares), factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante (TGF, factor de crecimiento de fibroblastos FGF, factores de crecimiento endotelial vascular VEGF, y similares), antígenos del MHC de clase I o II, inductores o inhibidores de la apoptosis (por ejemplo, Bax, Bcl2, BclX...), agentes citostáticos (p21, p16, Rb...), inmunotoxinas, polipéptidos antigénicos (polipéptidos antigénicos, epítomos, y similares), y marcadores (beta-galactosidasa, luciferasa...). Preferentemente, la proteína inmunoestimulante es una interleucina o un factor estimulante de colonias, con preferencia específica por GM-CSF.

#### Modulador o moduladores de puntos de control inmunitario

Los puntos de control inmunitarios y sus moduladores, así como los métodos de uso de tales compuestos, se describen en la bibliografía. Según esta invención y divulgación, el uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios pueden ser independientemente un polipéptido que comprende un dominio capaz de unirse al punto de control inmunitario seleccionado como diana, y/o de inhibir la unión de un ligando a dicho punto de control inmunitario seleccionado como diana, para ejercer una función antagonista (es decir, ser capaz de antagonizar una señal inhibidora mediada por el punto de control inmunitario) o una función agonista (es decir, ser capaz de estimular una señal estimulante mediada por el punto de control inmunitario). Tal uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en péptidos (por ejemplo ligandos peptídicos), dominios solubles de receptores naturales, ARNi, moléculas antisentido, anticuerpos, y andamiajes proteínicos.

Preferentemente, el modulador de puntos de control inmunitarios es un anticuerpo. En el contexto de la invención y divulgación, "anticuerpo" ("Ab") se usa en el sentido más amplio, y comprende anticuerpos de origen natural y anticuerpos manipulados por el hombre, así como anticuerpos de longitud completa o fragmentos funcionales o análogos de los mismos que son capaces de unirse al punto de control inmunitario o al epítomo diana (reteniendo así la porción de unión a la diana). El anticuerpo codificado por el virus oncolítico de la invención y divulgación puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, humanizado, animal (por ejemplo anticuerpo de roedor o de camélido), o quimérico. Puede ser de cualquier isotipo (por ejemplo, isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, etc.). Además, puede estar glicosilado, parcialmente glicosilado, o no glicosilado (por ejemplo mutando uno o más restos en el sitio o sitios de glicosilación). El término anticuerpo asimismo incluye anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, en tanto que exhiban la especificidad de unión descrita en la presente memoria.

A título ilustrativo, los anticuerpos de longitud completa son glicoproteínas que comprenden por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), interconectadas mediante enlace de disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada, que está formada por tres dominios CH1, CH2 y CH3 (eventualmente con una bisagra entre CH1 y CH2). Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera, que comprende un dominio CL. Las regiones VH y VL comprenden regiones hipervariables, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de armazón estructural (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR en el siguiente orden: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Las regiones CDR de las cadenas pesada y ligera son determinantes para la especificidad de unión.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano (por ejemplo murino, de camello, de rata, etc.) cuya secuencia proteica se ha modificado para incrementar su similitud con un anticuerpo humano (es decir, producido naturalmente en seres humanos). El procedimiento de humanización es bien conocido en la técnica (véanse, por ejemplo, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20): 4593-

9; patentes US 5.225.539; US 5.530.101; US 6.180.370; documento WO2012/110360). Por ejemplo, el anticuerpo contra los puntos de control inmunitarios para uso en la presente memoria se puede humanizar sustituyendo uno o más restos de las regiones FR para que parezcan a una secuencia inmunoglobulínica humana, mientras que la inmensa mayoría de los restos de las regiones variables (especialmente las CDR) no se modifican y corresponden a los de una inmunoglobulina no humana. Como guía general, el número de estas sustituciones de aminoácidos en las regiones FR es típicamente no mayor que 20 en cada región variable VH o VL.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende uno o más elementos de una especie y uno o más elementos de otra especie, por ejemplo un anticuerpo no humano que comprende por lo menos una porción de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina humana.

Mediante el virus oncolítico de la invención y divulgación se pueden expresar muchas formas de anticuerpo. Los ejemplos representativos incluyen, sin limitación, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, dAb, Fd, Fv, scFv, di-scFv y diacuerpo, etc. Más específicamente:

- (i) un fragmento Fab representado por un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1;
- (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub> representado por un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante por lo menos un puente de disulfuro en la región bisagra;
- (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1;
- (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo,
- (v) un fragmento dAb que consiste en un fragmento variable de un solo dominio (dominio VH o VL);
- (vi) un Fv monocatenario (scFv) que comprende los dos dominios de un fragmento Fv, VL y VH, que están fusionados juntos, eventualmente con un enlazador para obtener una única cadena proteica (véanse, por ejemplo, Bird et al., 1988, Science 242: 423-6; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; patente US 4.946.778; patente US 5.258.498); y
- (vii) cualquier otro anticuerpo artificial.

Si es necesario, tales fragmentos y análogos se pueden cribar en busca de la funcionalidad, de la misma manera que con los anticuerpos intactos (por ejemplo, mediante ensayo ELISA estándar).

Preferentemente, por lo menos uno del uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios codificados por el virus oncolítico de la presente invención y divulgación es un anticuerpo monoclonal, con preferencia específica por un anticuerpo humano (en el que tanto las regiones de armazón estructural derivan de secuencias inmunoglobulinas de línea germinal humana) o un anticuerpo humanizado según el procedimiento de humanización bien conocido.

De forma deseable, el uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios codificados por el virus oncolítico de la presente invención y divulgación antagonizan por lo menos parcialmente (por ejemplo, más del 50%) la actividad de punto o puntos de control inmunitarios inhibidores, en particular los mediados por cualquiera de las siguientes PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, Tim3, BTLA y CTLA4, con preferencia específica por un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a cualquiera de tales proteínas diana. La expresión "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de una especificidad de unión y afinidad por una diana o epítipo particular incluso en presencia de una población heterogénea de otras proteínas y sustancias biológicas. De este modo, en las condiciones diseñadas del ensayo, el anticuerpo en uso en la invención y divulgación se une preferentemente a su diana, y no se une en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de ensayo o en un sujeto. Preferentemente, tal anticuerpo muestra una afinidad de unión elevada por su diana, con una constante de disociación en el equilibrio igual o por debajo de  $1 \times 10^{-6}$  M (por ejemplo, por lo menos  $0.5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$ , etc.). Como alternativa, el uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios codificados de la presente divulgación ejercen una función agonista, en el sentido de que es capaz de estimular o reforzar señales estimulantes, en particular las mediadas por CD28, con una preferencia específica por cualquiera de los puntos de control inmunitarios ICOS, CD137 (4-1BB), OX40, CD27, CD40, GITR. En la técnica se conocen ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a puntos de control inmunitario, incluyendo, por ejemplo, ELISAs, transferencias Western, RIAs, y citometría de flujo. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos asimismo se puede evaluar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tal como mediante el análisis de Biacore.

Preferentemente, por lo menos uno del uno o más moduladores de puntos de control codificados es un anticuerpo humano o humanizado capaz de antagonizar un punto de control inmunitario implicado en la respuesta mediada por células T. Un ejemplo preferido de un modulador de puntos de control inmunitarios está representado por un

modulador capaz de antagonizar por lo menos parcialmente la proteína de Muerte Programada 1 (PD-1), y especialmente un anticuerpo que se une específicamente a PD-1 humana. PD-1 es parte de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas (Ig), y es un miembro de la familia de CD28. Es una proteína transmembranaria de tipo 1 de 55 kDa, expresada en células que experimentan antígenos (por ejemplo células B activadas, células T, y células mieloides) (Agata et al., 1996, *Int. Immunol.* 8: 765-72; Okazaki et al., 2002, *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett et al., 2003, *J. Immunol.* 170: 711-8). En el contexto normal, actúa limitando la actividad de células T en el momento de la respuesta inflamatoria, protegiendo de ese modo a los tejidos normales de la destrucción (Topalian, 2012, *Curr. Opin. Immunol.* 24: 207-12). Se han identificado dos ligandos para PD-1, respectivamente PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) y PD-L2 (ligando 2 de muerte programada) (Freeman et al., 2000, *J. Exp. Med.* 192: 1027-34; Carter et al., 2002, *Eur. J. Immunol.* 32: 634-43). PD-L1 se identificó en 20-50% de cánceres humanos (Dong et al., 2002, *Nat. Med.* 8: 787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 dio como resultado una disminución en linfocitos infiltrantes del tumor, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de células T, y una evasión inmune por las células cancerosas (Dong et al., 2003, *J. Mol. Med.* 81: 281-7; Blank et al., 2005, *Cancer Immunol. Immunother.* 54: 307-314). Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos completas de PD-1 se pueden encontrar con el número de acceso de GenBank U64863 y NP\_005009.2. En la técnica hay disponible un número de anticuerpos anti PD1 (véanse, por ejemplo, los descritos en los documentos WO2004/004771; WO2004/056875; WO2006/121168; WO2008/156712; WO2009/014708; WO2009/114335; WO2013/043569; y WO2014/047350). Preferentemente, el virus oncolítico de la presente invención y divulgación codifica y expresa un anticuerpo anti PD-1 que está aprobado por la FDA o bajo desarrollo clínico avanzado, tal como los comercializados o desarrollados con los nombres de Nivolumab (asimismo denominado BMS-936558 bajo desarrollo por Bristol Myer Squibb), Pembrolizumab (asimismo denominado MK-3475 bajo desarrollo por Merck), y Pidilizumab (asimismo denominado CT-011 bajo desarrollo por CureTech). Las secuencias nucleotídicas correspondientes se pueden clonar o aislar según técnicas estándar con base en la información descrita en la bibliografía disponible.

Otro ejemplo preferido de modulador de puntos de control inmunitarios adecuado para la expresión mediante el virus oncolítico de la invención y divulgación está representado por un modulador capaz de antagonizar por lo menos parcialmente el ligando de PD-1, denominado PD-L1, y especialmente un anticuerpo que reconoce PD-L1 humano. En la técnica existe un gran número de anticuerpos anti PD-L1 (ver, por ejemplo, los descritos en el documento EP1907000). Los anticuerpos anti PD-L1 preferidos son los aprobados por la FDA o bajo desarrollo clínico avanzado (MPDL3280A bajo desarrollo por Genentech/Roche, y BMS-936559 bajo desarrollo por Bristol Myer Squibb, así como fusiones de Fc anti-PD-L1 (por ejemplo, AMP-224 desarrollado por Medimmune y AstraZeneca).

Asimismo se puede usar un antagonista de la proteína VISTA recientemente identificada, que se mostró que regula de forma negativa las respuestas de células T (Wang et al., 2011, *J. Exp. Med.* 208(3): 577-592). VISTA, asimismo denominada PD-1H y PD-L3, se asemeja a los miembros de la familia de PD-L1. Por ejemplo, en el documento US2013-0177557 se describen antagonistas anti-VISTA.

Todavía otro ejemplo preferido de modulador de puntos de control inmunitarios adecuado está representado por un modulador capaz de antagonizar por lo menos parcialmente la proteína CTLA-4, y especialmente un anticuerpo que reconoce CTLA-4 humana. CTLA4 (por antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos), asimismo conocida como CD152, se identificó en 1987 (Brunet et al., 1987, *Nature* 328: 267-70), y está codificada por el gen CTLA4 (Dariavach et al., *Eur. J. Immunol.* 18: 1901-5). CTLA4 es un miembro de la superfamilia inmunoglobulínica de receptores. Se expresa en la superficie de células T auxiliares, en las que regula principalmente la amplitud de las etapas tempranas de la activación de células T. Un trabajo reciente ha sugerido que CTLA-4 puede funcionar *in vivo* capturando y eliminando B7-1 y B7-2 de las membranas de células presentadoras de antígeno, haciéndolas así indisponibles para la activación de CD28 (Qureshi et al., *Science*, 2011, 332: 600-3). La secuencia completa de ácido nucleico de CTLA-4 se puede encontrar bajo el número de acceso de GenBank LI 5006. En la técnica hay un gran número de anticuerpos anti CTLA-4 (véanse, por ejemplo, los descritos en la patente US 8.491.895). Los anticuerpos anti CTLA-4 preferidos en el contexto de esta invención y divulgación son los aprobados por la FDA o bajo desarrollo clínico avanzado. Se pueden citar, más particularmente, ipilimumab, comercializado por Bristol Myer Squibb como Yervoy (véanse, por ejemplo, las patentes US 6.984.720; US 8.017.114), tremelimumab, bajo desarrollo por Pfizer (ver, por ejemplo, las patentes US 7.109.003 y US 8.143.379), y anticuerpos monocatenarios anti-CTLA4 (véanse, por ejemplo, los documentos WO97/20574 y WO2007/123737).

El virus oncolítico de la presente invención y divulgación asimismo puede expresar un modulador de puntos de control inmunitarios para antagonizar el receptor de LAG3 (ver, por ejemplo, la patente US 5.773.578).

Otro ejemplo de modulador de puntos de control inmunitarios adecuados está representado por un agonista de OX40, tal como el ligando agonista de OX40 (OX40L) (ver, por ejemplo, las patentes US 5.457.035, US 7.622.444; el documento WO03/082919) o un anticuerpo dirigido contra el receptor de OX40 (ver, por ejemplo, la patente US 7.291.331 y el documento WO03/106498).

Otros ejemplos de moduladores de puntos de control inmunitarios están representados por anticuerpos anti-KIR o anti-CD96, dirigidos contra los receptores inhibidores que se encuentran en células T CD8+ y células NK.

La presente invención y divulgación comprende un virus oncolítico que codifica más de un modulador de puntos de control inmunitarios. Un ejemplo preferido incluye, sin limitación, la expresión de un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-1.

5

Expresión de la una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios y, si los hay, de los genes terapéuticos insertados en el genoma vírico.

10

La molécula o moléculas de ácidos nucleicos que codifican los moduladores de puntos de control inmunitario, y el gen terapéutico, se pueden obtener fácilmente mediante técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo amplificación mediante PCR, clonación de ADNc, síntesis química) usando datos de secuencia accesibles en la técnica y la información proporcionada en la presente memoria. Los métodos para clonar anticuerpos, fragmentos y sus análogos son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988, Antibodies-A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY). Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc) que codifica las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o sus CDR, se puede aislar a partir del hibridoma productor (véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975, Nature 256: 495-7; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-30; Cole et al. en Monoclonal antibodies and Cancer Therapy; Alan Liss p. 77-96), a partir de genotecas de inmunoglobulinas, o a partir de cualquier fuente disponible, o la secuencia nucleotídica se puede generar mediante síntesis química. Los análogos y fragmentos se pueden generar usando técnicas estándar de biología molecular.

15

20

25

La molécula o moléculas de ácidos nucleicos que codifican el modulador o moduladores de puntos de control inmunitario, y eventualmente el gen o genes terapéuticos, se pueden insertar independientemente en cualquier localización del genoma vírico, con preferencia específica por un locus no esencial. La inserción en el virus oncolítico se puede llevar a cabo mediante biología molecular habitual, por ejemplo como se describe en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory). La inserción en un vector adenovírico o en un vector poxvírico se puede llevar a cabo a través de recombinación homóloga, como se describe respectivamente en Chartier et al. (1996, J. Virol. 70: 4805-10) y Paul et al. (2002, Cancer gene Ther. 9: 470-7). Por ejemplo, los genes TK, RR y F2L, así como las regiones intergénicas, son particularmente adecuados para la inserción en el virus vaccinia oncolítico, y las regiones E3 y E4 para la inserción en el virus adenovírico oncolítico.

30

35

Además, las secuencias nucleotídicas codificantes se pueden optimizar para proporcionar una expresión de alto nivel en una célula hospedante o sujeto particular. De hecho, se ha observado que los patrones de uso de codones de los organismos carecen enormemente de aleatoriedad, y el uso de codones puede ser notablemente diferente entre hospedantes diferentes. Por ejemplo, el gen terapéutico puede ser de origen bacteriano o eucariota inferior (por ejemplo, el gen suicida), y de este modo tiene un patrón de uso de codones inapropiado para la expresión eficiente en células eucariotas superiores (por ejemplo, ser humano). Típicamente, la optimización de codones se lleva a cabo sustituyendo uno o más codones "nativos" (por ejemplo bacteriano o de levadura), que corresponde a un codón usado infrecuentemente en el organismo hospedante de interés, por uno o más codones que codifican el mismo aminoácido, que se usan más frecuentemente. No es necesario sustituir todos los codones nativos que corresponden a los codones usados infrecuentemente, ya que se puede lograr una mayor expresión incluso con una sustitución parcial.

40

45

Además de la optimización del uso de codones, la expresión en la célula hospedante o sujeto se puede mejorar adicionalmente a través de modificaciones adicionales de la secuencia o secuencias nucleotídicas. Por ejemplo, se pueden concebir diversas modificaciones para evitar el agrupamiento de codones raros, no óptimos, que están presentes en áreas concentradas, y/o para suprimir o modificar elementos de secuencia "negativos", que se espera que influyan negativamente en los niveles de expresión. Tales elementos de secuencia negativos incluyen, sin limitación, la región que tiene un contenido de GC muy elevado (>80%) o muy bajo (<30%); tramos de secuencias ricos en AT o ricos en GC; secuencias de repetición directas o invertidas inestables; estructuras secundarias R A; y/o elementos reguladores crípticos internos, tales como cajas TATA internas, sitios chi, sitios de entrada al ribosoma, y/o sitios dadores/aceptores de ajuste.

50

55

Según la presente invención y divulgación, cada una de las una o más moléculas de ácidos nucleicos que codifican dicho modulador o moduladores de puntos de control inmunitario, así como el gen o genes terapéuticos, insertados en el genoma del virus oncolítico de la invención y divulgación, está enlazado operablemente a elementos reguladores adecuados para su expresión en una célula hospedante o sujeto. Como se usa en la presente memoria, la expresión "elementos reguladores" o "secuencia reguladora" se refiere a cualquier elemento que permite, contribuye o modula la expresión de la molécula o moléculas de ácidos nucleicos codificantes en una célula hospedante o sujeto dado, incluyendo la replicación, duplicación, transcripción, ajuste, traducción, estabilidad y/o transporte del ácido o ácidos nucleicos o su derivado (es decir, ARNm). Como se usa en la presente memoria, "operablemente enlazado" significa que los elementos que se enlazan están dispuestos de manera que funcionan concertadamente para sus fines pretendidos. Por ejemplo, un promotor está operablemente enlazado a una molécula de ácido nucleico si el promotor efectúa la transcripción desde el inicio de la transcripción hasta el terminador de dicha molécula de ácido nucleico en una célula hospedante permisiva.

60

65

Los expertos en la materia apreciarán que la elección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la propia molécula de ácido nucleico, el virus en el que se inserta, la célula hospedante o sujeto, el nivel de expresión deseado, etc. El promotor es de especial importancia. En el contexto de la invención y divulgación, puede ser constitutivo, dirigiendo la expresión de la molécula de ácido nucleico en muchos tipos de células hospedantes, o específico de ciertas células hospedantes (por ejemplo secuencias reguladoras específicas del hígado), o puede estar regulado en respuesta a sucesos o factores exógenos específicos (por ejemplo, mediante temperatura, aditivo nutriente, hormona, etc.) o según la fase de un ciclo vírico (por ejemplo, tardía o temprana). Asimismo se pueden usar promotores que se reprimen durante la etapa de producción en respuesta a sucesos o factores exógenos específicos, a fin de optimizar la producción del virus y eludir la toxicidad potencial del polipéptido o polipéptidos expresados.

Los promotores adecuados para la expresión constitutiva en células de mamífero incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) (patente US 5.168.062), el promotor de RSV, el promotor tardío principal del adenovirus, el promotor de fosfoglicero cinasa (PGK) (Adra et al., 1987, Gene 60: 65-74), el promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV-1), y el promotor de T7 polimerasa (documento WO98/10088). Los promotores del virus vaccinia están particularmente adaptados para la expresión en poxvirus oncolíticos. Los ejemplos representativos incluyen, sin limitación, los promotores del virus vaccinia 7.5K, H5R, 11K7.5 (Erbs et al., 2008, Cancer Gene Ther. 15(1): 18-28), TK, p28, p11, pB2R, pA35R y K1L, así como promotores sintéticos tales como los descritos en Chakrabarti et al. (1997, Biotechniques 23: 1094-7; Hammond et al, 1997, J. Virol Methods 66: 135-8; y Kumar y Boyle, 1990, Virology 179: 151-8), así como promotores quiméricos tempranos/tardíos. Los promotores adecuados para los virus del sarampión oncolíticos incluyen, sin limitación, cualquier promotor que dirige la expresión de las unidades de transcripción del sarampión (Brandler y Tangy, 2008, CIMID 31: 271).

En particular, cuando el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios codificados comprenden un anticuerpo, y especialmente un mAb, con preferencia específica por un anticuerpo anti-PD1, la expresión de la cadena pesada, o su fragmento, se coloca bajo el control de un promotor que es más fuerte que el usado para expresar la cadena ligera o su fragmento. En particular, el promotor para uso para expresar el componente pesado proporciona por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, o por lo menos 30% más de producto en comparación con la expresión de dicho componente ligero. Los promotores apropiados para la expresión se pueden evaluar *in vitro* (por ejemplo en una estirpe celular cultivada adecuada) o *in vivo* (por ejemplo en un modelo de animal adecuado o en un sujeto). Los ejemplos de promotores adecuados para expresar el componente pesado de dicho modulador de puntos de control inmunitarios comprenden promotores del CMV, RSV y del virus vaccinia pH5R y p11K7.5. Los ejemplos de promotores adecuados para expresar el componente ligero de dicho modulador de puntos de control inmunitarios comprenden los promotores de PGK, beta-actina y del virus vaccinia p7.5K y pA35R.

Los expertos en la materia apreciarán que los elementos reguladores que controlan la expresión de la molécula o moléculas de ácidos nucleicos insertadas en el genoma vírico pueden comprender además elementos adicionales para la iniciación, regulación y/o terminación apropiadas de la transcripción (por ejemplo, secuencias de terminación de la transcripción de poliA), transporte de ARNm (por ejemplo secuencias señal de localización nuclear), procesamiento (por ejemplo señales de ajuste), y estabilidad (por ejemplo intrones y secuencias 5' y 3' no codificantes), traducción (por ejemplo una Met iniciadora, secuencias líder tripartitas, sitios de unión al ribosoma IRES, péptidos señal, etc.).

Cuando sea apropiado, puede ser ventajoso incluir elementos reguladores adicionales, para facilitar la expresión, tráfico y actividad biológica de por lo menos un gen insertado en el genoma vírico del virus oncolítico de la invención y divulgación (es decir, el gen o genes terapéuticos y/o el uno o más moduladores de puntos de control inmunitario). Por ejemplo, se puede incluir un péptido señal para facilitar la secreción a partir de la célula infectada. El péptido señal se inserta típicamente en el término N de la proteína, inmediatamente después del iniciador de Met. La elección de los péptidos señal es amplia, y es accesible expertos en la materia. Asimismo se puede concebir la adición de un dominio transmembranario, para facilitar el anclaje de la proteína o proteínas codificadas a una membrana adecuada (por ejemplo la membrana plasmática) de las células infectadas. El dominio transmembranario se inserta típicamente en el término C de la proteína, justo antes o muy próximamente al codón STOP. En la técnica existe una amplia variedad de dominios transmembranarios (ver, por ejemplo, el documento WO99/03885).

Como ejemplo adicional, asimismo se puede añadir una etiqueta peptídica (típicamente una secuencia peptídica corta capaz de ser reconocida por antisueros o compuestos disponibles) para seguir la expresión, tráfico o purificación del producto génico codificado. En el contexto de la invención y divulgación se puede usar una amplia variedad de péptidos etiquetadores, incluyendo, sin limitación, la etiqueta de PK, el octapéptido FLAG, la etiqueta de MYC, la etiqueta de HIS (habitualmente un tramo de 4 a 10 restos de histidina), y la etiqueta e (patente US 6.686.152). El péptido o péptidos etiquetadores se pueden situar independientemente en el término N de la proteína, o como alternativa, en su término C, o como alternativa, internamente, o en cualquiera de estas posiciones cuando se emplean varias etiquetas. Los péptidos etiquetadores pueden ser detectados mediante ensayos de inmunodetección usando anticuerpos anti-etiqueta.

Como otro ejemplo, se puede alterar la glicosilación para incrementar la actividad biológica del producto génico codificado (por ejemplo, para incrementar). Tales modificaciones se pueden lograr, por ejemplo, mutando uno o más restos en el sitio o sitios de glicosilación. Los patrones de glicosilación alterados pueden incrementar la capacidad de ADCC de los anticuerpos, y/o su afinidad por su diana.

Otro enfoque que se puede lograr en el contexto de la presente invención y divulgación es el acoplamiento del producto génico, codificado por el virus oncolítico de la invención y divulgación, a un agente externo tal como un agente citotóxico y/o un agente marcador. Como se usa en la presente memoria, la expresión "agente citotóxico" se refiere a un compuesto que es directamente tóxico para las células, que evita su reproducción o crecimiento, tal como toxinas (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma). Como se usa en la presente memoria, "un agente marcador" se refiere a un compuesto detectable. El agente marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores isotópicos radioactivos o marcadores fluorescentes), o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto o sustrato que es detectable. El acoplamiento se puede llevar a cabo mediante fusión genética entre el producto génico (gen o genes terapéuticos y/o modulador o moduladores de puntos de control inmunitario) y el agente externo.

Preferentemente, el virus oncolítico de la invención y divulgación es un virus vaccinia (preferentemente de la cepa de Copenhague) defectuoso para las actividades tanto de TK como de RR (por ejemplo, que resulta de mutaciones inactivantes en los genes víricos tanto J2R como I4L), en cuyo genoma se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-PD1. De forma deseable, los elementos de las cadenas pesada y ligera (por ejemplo cadenas pesada y ligera para la expresión de mAb, o sus fragmentos variables para la expresión de Fab y scFv) se colocan respectivamente bajo el control transcripcional de los promotores del virus vaccinia pH5R y p7.5K. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico que codifica anti-PD1 se inserta en el locus de TK del genoma vírico. Más preferentemente, dicho virus vaccinia está armado con un gen suicida, con preferencia especial por el gen suicida FCU1 descrito en la presente memoria. Incluso más preferentemente, el gen suicida (por ejemplo FCU1) está bajo el control transcripcional del promotor del virus vaccinia p11K7.5. Aún más preferentemente, el FCU1, colocado bajo el control del promotor del virus vaccinia, se inserta en el locus de TK del genoma vírico.

En una alternativa, y asimismo un ejemplo preferido, el virus oncolítico de la divulgación es un virus vaccinia (preferentemente de la cepa Wyeth) defectuoso para la actividad de TK (que resulta de mutaciones inactivantes en el gen vírico J2R), en cuyo genoma se inserta una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-PD1. Más preferentemente, dicho virus vaccinia está armado con un gen terapéutico inmunoestimulante, con especial preferencia por el gen GM-CSF humano descrito en la presente memoria. Incluso más preferentemente, el gen terapéutico (por ejemplo GM-CSF) está bajo el control transcripcional de un promotor del virus vaccinia temprano-tardío sintético, y está insertado preferentemente en el locus de TK.

Típicamente, el virus oncolítico de la presente invención y divulgación se produce en una estirpe celular huésped adecuada, usando técnicas convencionales que incluyen cultivar la célula hospedante transfectada o infectada en condiciones adecuadas para permitir la producción de partículas víricas infecciosas, y recuperar las partículas víricas infecciosas producidas a partir del cultivo de dicha célula, y opcionalmente purificar dichas partículas víricas infecciosas recuperadas. Las células hospedantes adecuadas para la producción del virus oncolítico incluyen, sin limitación, estirpes celulares humanas tales como HeLa (ATCC), células 293 (Graham et al., 1997, J. Gen. Virol. 36: 59-72), HER96, PER-C6 (Fallaux et al., 1998, Human Gene Ther. 9: 1909-17), células aviares, tales como las descritas en los documentos WO2005/042728, WO2006/108846, WO2008/129058, WO2010/130756, WO2012/001075, etc.), estirpes celulares de hámster, tales como BHK-21 (ATCC CCL-10), así como fibroblastos de embriones de pollo primarios (CEF) preparados a partir de embriones de pollo obtenidos de huevos fertilizados. El virus oncolítico se puede aislar por lo menos parcialmente antes de usarlo según la presente invención y divulgación. Se pueden concebir diversas etapas de purificación, que incluyen etapas de clarificación, tratamiento enzimático (por ejemplo, benzonasa, proteasa), cromatográficas y de filtración. Los métodos apropiados se describen en la técnica (por ejemplo, documentos WO2007/147528; WO2008/138533, WO2009/100521, WO2010/130753, WO2013/022764).

#### Producción de modulador de puntos de control inmunitario

El virus oncolítico asimismo se puede utilizar para producir, por medios recombinantes, el uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios que aquél codifica. Ventajosamente, puede comprender uno o más elementos adicionales que permiten el mantenimiento, propagación o expresión de la molécula de ácido nucleico que codifica el modulador de puntos de control inmunitarios en una célula hospedante. Tales elementos adicionales comprenden gen o genes marcadores, a fin de facilitar la identificación y aislamiento de las células hospedantes productoras (por ejemplo mediante complementación de una auxotrofia celular, o mediante resistencia a antibióticos. Los genes marcadores adecuados incluyen, sin limitación, dihidrofolato reductasa (dhfr), que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981, J.

Mol. Biol. 150: 1); zeo, que confiere resistencia a zeomicina; kana, que confiere resistencia a kanamicina; higo, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., 1984, Gene 30: 147). Los virus recombinantes que carecen de una TK funcional (por ejemplo que resultan de la inserción de la molécula de ácido nucleico que codifica el modulador de puntos de control inmunitarios en el locus de TK) se pueden seleccionar con medios que contienen bromodesoxiuridina (BrdU). De hecho, los virus TK- son insensibles al fármaco BrdU, mientras que el fármaco interfiere con la síntesis de ADN en virus TK+. Asimismo nos podemos basar en sistemas luminiscentes o colorimétricos informadores, por ejemplo con base en GFP (proteína fluorescente verde), luciferasa y beta-galactosidasa.

Los métodos para producir recombinantemente el modulador de puntos de control inmunitarios son convencionales en la técnica. Típicamente, tales métodos comprenden (a) introducir el virus oncolítico descrito en la presente memoria en una célula productora adecuada para producir una célula productora transfectada o infectada, (b) cultivar in vitro dicha célula productora transfectada o infectada en condiciones adecuadas para su crecimiento, (c) recuperar el uno o más moduladores de puntos de control inmunitarios del cultivo celular, y (d) opcionalmente, purificar el modulador o moduladores de puntos de control inmunitarios recuperados. Las células productoras son preferentemente células eucariotas humanas o no humanas. Las células productoras preferidas incluyen, sin limitación, BHK-21 (riñón de cría de hámster), CV-1 (estirpe celular de riñón de mono africano), células COS (por ejemplo COS-7), células de ovario de hámster chino (CHO), células NIH/3T3 de ratón, células de mieloma NSO de ratón, células HeLa, células Vero, células HEK293 y células PERC.6, y células aviares (por ejemplo células de pollo, de pato, como se describe en la presente memoria).

Las células productoras se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, en matraces, y en cápsulas de Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula hospedante dada. No se harán en la presente memoria intentos por describir con detalle los diversos métodos conocidos para la producción de proteínas en células eucariotas. La producción del modulador de puntos de control inmunitarios puede ser intracelular, o preferentemente se puede segregar fuera de la célula productora (por ejemplo en el medio de cultivo).

El modulador de puntos de control inmunitarios se puede purificar entonces mediante métodos de purificación bien conocidos. Las condiciones y tecnología usadas para purificar una proteína particular dependerán de factores tales como las condiciones de expresión, la carga neta, el peso molecular, la hidrofobia, la hidrofilia, y serán manifiestas para aquellos que tienen pericia en la técnica. Además, el nivel de purificación dependerá del uso pretendido. Si es necesario, especialmente cuando el modulador de puntos de control inmunitarios no se segrega de la célula productora, o cuando no se segrega completamente, se puede recuperar mediante procedimientos de lisis estándar, incluyendo congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonidos, destrucción mecánica, uso de agentes lisantes, y similares. Si se segrega, se puede recuperar directamente del medio de cultivo. Las técnicas de purificación adecuadas incluyen, sin limitación, precipitación con sulfato de amonio, extracción con ácidos, electroforesis en gel, filtración, y métodos cromatográficos (por ejemplo cromatografía de fase inversa, de exclusión molecular, de intercambio iónico, de afinidad, con fotocelulosa, de interacción hidrófoba, o con hidroxilapatita, etc.). De forma deseable, el modulador de puntos de control inmunitarios producido recombinantemente por el virus oncolítico está purificado por lo menos parcialmente, en el sentido de que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas y/u otro material celular. Además, el modulador de puntos de control inmunitarios se puede formular según las condiciones usadas convencionalmente en la técnica (por ejemplo, documento WO2009/073569).

#### Uso terapéutico

La presente invención asimismo proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del virus oncolítico de la invención, y un vehículo aceptable farmacéutico.

Más generalmente, la presente divulgación asimismo proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del virus oncolítico de la invención y divulgación, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones se pueden administrar una vez o varias veces, y vía las mismas rutas, o diferentes

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" corresponde a la cantidad de virus oncolítico que es suficiente para producir uno o más resultados beneficiosos. Tal cantidad terapéuticamente eficaz puede variar en función de diversos parámetros, en particular el modo de administración; el estado de la enfermedad; la edad y peso del sujeto; la capacidad del sujeto para responder al tratamiento; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia del tratamiento; y/o la necesidad de prevención o terapia. Cuando está implicado el uso profiláctico, el virus oncolítico o la composición de la invención y divulgación se administra a una dosis suficiente para prevenir o retrasar el comienzo y/o establecimiento y/o recaída de una afección patológica (por ejemplo, una enfermedad proliferativa tal como cáncer) especialmente en un sujeto en riesgo. Para uso "terapéutico", el virus oncolítico o la composición de la presente invención y divulgación se administra a un sujeto diagnosticado por tener una afección patológica (por ejemplo, una enfermedad proliferativa tal como cáncer) con el objeto de tratar la enfermedad, eventualmente en asociación con una o más modalidades terapéuticas convencionales. En particular, una cantidad

5 terapéuticamente eficaz podría ser aquella cantidad necesaria para provocar una mejora observable del estado clínico con respecto al estado de inicio, o con respecto al estado esperado si no se trata, por ejemplo reducción en el número de tumores, reducción en el tamaño tumoral, reducción en el número o grado de metástasis, aumento en la duración de la remisión, estabilización (es decir, sin empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o  
 10 ralentización de la progresión o gravedad de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, supervivencia prolongada, mejor respuesta al tratamiento estándar, mejora de la calidad de vida, mortalidad reducida, etc. Una cantidad terapéuticamente eficaz podría ser asimismo la cantidad necesaria para provocar el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral no específica (innata) y/o específica eficaz. Típicamente, el desarrollo de una respuesta inmune, en particular una respuesta de células T, se puede evaluar in vivo, en modelos  
 15 de animal adecuados, o usando muestras biológicas recogidas del sujeto. Por ejemplo, se pueden usar técnicas usadas habitualmente en los laboratorios (por ejemplo, citometría de flujo, histología) para llevar a cabo la vigilancia del tumor. Asimismo se pueden usar diversos anticuerpos disponibles, para identificar diferentes poblaciones de células inmunes implicadas en la respuesta antitumoral que están presentes en los sujetos tratados, tales como células T citotóxicas, células T citotóxicas activadas, células asesinas naturales y células asesinas naturales activadas. Una mejora del estado clínico se puede evaluar fácilmente por cualquier medida clínica relevante usada típicamente por los médicos u otro personal de la salud experimentado.

20 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los portadores, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes absorbentes, y similares, compatibles con la administración en mamíferos, y en particular en sujetos humanos.

25 El virus oncolítico o la composición del mismo se pueden colocar en un disolvente o diluyente apropiado para uso humano o animal. El disolvente o diluyente es preferentemente isotónico, hipotónico, o débilmente hipertónico, y tiene una fuerza iónica relativamente baja. Los ejemplos representativos incluyen agua estéril, disolución salina fisiológica (por ejemplo, cloruro de sodio), disolución de Ringer, glucosa, disoluciones de trehalosa o de sacarosa, disolución de Hank, y otras disoluciones salinas acuosas fisiológicamente balanceadas (véase, por ejemplo, la edición más actual de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams&Wilkins).

30 En un ejemplo, la composición del virus oncolítico está amortiguada adecuadamente para uso humano. Los amortiguadores adecuados incluyen, sin limitación, amortiguador de fosfato (por ejemplo, PBS), amortiguador de bicarbonato, y/o amortiguador de Tris, capaces de mantener un pH fisiológico o ligeramente básico (por ejemplo, desde aproximadamente pH 7 hasta aproximadamente pH 9).

35 Las composiciones del virus oncolítico asimismo pueden contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables, para proporcionar propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables, incluyendo, por ejemplo, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución de la formulación, modificación o mantenimiento de la liberación o absorción en el sujeto humano o animal, promoción del transporte a través de la barrera sanguínea o penetración en un órgano particular.

45 Las composiciones del virus oncolítico asimismo pueden comprender uno o más adyuvantes capaces de estimular la inmunidad (especialmente una inmunidad mediada por células T) o de facilitar la infección de células tumorales al administrarlas, por ejemplo a través de receptores de tipo toll (TLR), tales como TLR-7, TLR-8 y TLR-9, incluyendo, sin limitación, alumbre, emulsión de aceite mineral, tal como adyuvante completo e incompleto de Freund (IFA), lipopolisacárido o un derivado del mismo (Ribi et al., 1986, Immunology and Immunopharmacology of Bacterial Endotoxins, Plenum Publ. Corp., NY, p. 407-419), saponinas tales como QS21 (Sumino et al., 1998, J. Virol. 72: 4931; documento WO98/56415), compuestos de imidazo-quinolina tal como Imiquimod (Suader, 2000, J. Am Acad Dermatol. 43:S6), S-27609 (Smorlesi, 2005, Gene Ther. 12: 1324), y compuestos relacionados, tales como los descritos en el documento WO2007/147529, citosina fosfato guanosina oligodesoxinucleótidos, tal como CpG (Chu et al., 1997, J. Exp. Med. 186: 1623; Tritel et al., 2003, J. Immunol. 171: 2358), y péptidos catiónicos tal como IC-31 (Kritsch et al., 2005, J. Chromatogr Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 822: 263-70).

55 La composición del virus oncolítico de la presente invención y divulgación se puede formular con el objetivo de mejorar su estabilidad, en particular en las condiciones de fabricación y almacenamiento a largo plazo (es decir, durante por lo menos 6 meses, con preferencia durante por lo menos dos años) a temperaturas de congelación (por ejemplo, -70, -20), refrigeradas (por ejemplo, 4), o ambiente. Diversas formulaciones del virus están disponibles en la técnica ya sea en forma congelada, en forma líquida o en forma liofilizada (por ejemplo, documentos WO98/02522, WO01/66137, WO03/053463, WO2007/056847 y WO2008/114021, etc.). Las composiciones sólidas (por ejemplo, en polvo seco o liofilizadas) se pueden obtener mediante un procedimiento que implica secar a vacío y liofilizar (véase, por ejemplo, el documento WO2014/053571). Con fines ilustrativos, las formulaciones amortiguadas que incluyen NaCl y azúcar están particularmente adaptadas a la conservación de los virus (por ejemplo Tris 10 mM pH 8 con sacarosa al 5% (p/v), glutamato de sodio 10 mM, y NaCl 50 mM o disolución salina amortiguada con fosfato con glicerol (10%) y NaCl).

65

La composición del virus oncolítico se puede formular para asegurar la distribución apropiada o una liberación retrasada *in vivo*. Por ejemplo, se puede formular en liposomas. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como etileno-acetato de etilo, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, poliortoésteres, y poliácido láctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones se describen, por ejemplo, por J. R. Robinson en "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

La dosis apropiada de virus oncolítico se puede adaptar en función de diversos parámetros, y se puede determinar normalmente por un profesional a la luz de las circunstancias relevantes. La dosis adecuada para el virus oncolítico varía desde aproximadamente  $10^5$  hasta aproximadamente  $10^{13}$  pv (partículas víricas), ui (unidad infecciosa) o pfu (unidades formadoras de placas), dependiendo del virus y de la técnica cuantitativa usada. Como guía general, son adecuadas dosis del virus vaccinia de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^{13}$  pfu, preferentemente de aproximadamente  $10^6$  pfu a aproximadamente  $10^{11}$  pfu, más preferentemente de aproximadamente  $10^7$  pfu a aproximadamente  $5 \times 10^9$  pfu; se prefieren particularmente dosis de aproximadamente  $10^8$  pfu a aproximadamente  $10^9$  pfu, especialmente para uso humano. La cantidad de virus presente en una muestra se puede determinar mediante técnicas de titulación habituales, por ejemplo contando el número de placas tras la infección de células permisivas usando células permisivas (por ejemplo, BHK-21 o CEF), inmunotinción (por ejemplo, usando anticuerpos anti-virus; Carroll et al., 1997, Virology 238: 198-211), midiendo la absorbancia a A260 (títulos de pv), o asimismo mediante inmunofluorescencia cuantitativa (títulos de ui).

Preferentemente, la administración o administraciones de dicha composición de virus oncolítico permite suministrar por lo menos 50 ng/ml en una muestra corporal obtenida del sujeto. En una forma de realización, dicho nivel de punto de control inmunitario se obtiene tras una única administración de aproximadamente  $10^7$  pfu a aproximadamente  $5 \times 10^9$  pfu del virus oncolítico descrito en la presente memoria, y se puede incrementar adicionalmente con la administración o administraciones subsiguientes. En otro ejemplo, la muestra corporal es sangre, suero, plasma, biopsia tumoral, homogeneizado tumoral, fluido tumoral, etc., y se recoge por lo menos una hora hasta un mes tras dicha administración o administraciones. Más preferentemente, la producción *in situ* del modulador de puntos de control inmunitarios codificado alcanzó por lo menos 100 ng (por ejemplo, por lo menos 200 ng/ml, por lo menos 400 ng/ml, por lo menos 500 ng/ml, por lo menos 700 ng/ml, por lo menos 800 ng/ml, por lo menos 900 ng/ml, por lo menos 1000 ng/ml, por lo menos 1200 ng/ml, por lo menos 1500 ng/ml, por lo menos 1800 ng/ml, por lo menos 2000 ng/ml, por lo menos 2500 ng/ml, y por lo menos 3000 ng/ml) por ml de dicha muestra biológica recogida del sujeto 2 a 8 días (por ejemplo, 3 a 7 días, o más preferentemente alrededor de 5 días) tras la administración de dicho virus oncolítico. Los niveles de inhibidor de puntos de control inmunitarios segregado *in situ* se pueden evaluar como se describe en los Ejemplos.

#### Administración

El virus oncolítico o la composición de la presente invención y divulgación se puede administrar en una única dosis (por ejemplo, inyección de bolo) o en múltiples dosis. Si es en múltiples administraciones, se pueden llevar a cabo por las mismas vías o diferentes, y pueden tener lugar en el mismo sitio o en sitios alternativos. Asimismo es posible proceder vía ciclos secuenciales de administraciones, que se repiten tras un período de descanso. Los intervalos entre cada administración pueden ser desde varias horas hasta un año (por ejemplo, 24 h, 48 h, 72 h, semanalmente, cada 2 semanas, mensualmente, o anualmente). Los intervalos asimismo pueden ser irregulares (por ejemplo, tras la progresión tumoral). Las dosis pueden variar para cada administración dentro del intervalo descrito anteriormente.

En el contexto de la invención y divulgación, es aplicable cualquiera de las vías de administración convencionales, incluyendo las vías parenteral, tópica o mucosal. Las vías parenterales están destinadas para la administración como una inyección o infusión. Los tipos de inyección parenteral habituales son intravenoso (en la vena), intraarterial (en una arteria), intradérmico (en la dermis), subcutáneo (bajo la piel), intramuscular (en el músculo), e intratumoral (en el tumor o próximo a él). Las infusiones se administran típicamente mediante la vía intravenosa. Las administraciones mucosales incluyen, sin limitación, la vía oral/alimentaria, intranasal, intratraqueal, intrapulmonar, intravaginal o intrarrectal. La administración tópica asimismo se puede llevar a cabo usando medios transdérmicos (por ejemplo, parche y similar). Las administraciones pueden usar jeringuillas y agujas convencionales (por ejemplo, agujas de inyección Quadrafuse), o cualquier compuesto o dispositivo disponible en la técnica capaz de facilitar o mejorar el suministro del agente o agentes activos en el sujeto. Las vías preferidas de administración para el virus oncolítico incluyen las vías intravenosa e intratumoral.

En el contexto de la invención y divulgación, el virus oncolítico se puede administrar una o varias veces (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces, etc.) a una dosis en el intervalo de  $10^7$  a  $5 \times 10^9$  pfu. El intervalo de tiempo entre cada administración puede variar desde aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 8 semanas, ventajosamente desde aproximadamente 2 días hasta aproximadamente 6 semanas, preferentemente desde aproximadamente 3 días hasta aproximadamente 4 semanas, e incluso más preferentemente desde aproximadamente 1 semana hasta aproximadamente 3 semanas (por ejemplo, cada dos semanas). Un esquema terapéutico preferido implica de 2 a 5 (por ejemplo, 3) administraciones intravenosas o intratumorales de  $10^8$  o  $10^9$  pfu del virus vaccinia oncolítico en aproximadamente 1 o 2 semanas de intervalo.

5 La presente invención asimismo se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del virus oncolítico de la invención y un vehículo farmacéutico aceptable, para uso para tratar una enfermedad proliferativa, preferentemente un cáncer. La presente divulgación asimismo se refiere a un método para tratar una enfermedad proliferativa, tal como cáncer, que comprende administrar un virus oncolítico como se describe en la presente memoria a un sujeto que lo necesite.

10 La presente divulgación asimismo se refiere a un método para inhibir *in vivo* el crecimiento de células tumorales, que comprende administrar un virus oncolítico como se describe en la presente memoria a un sujeto que lo necesite.

15 La presente divulgación asimismo se refiere a un método para potenciar una respuesta inmune frente a células tumorales, que comprende administrar un virus oncolítico como se describe en la presente memoria a un sujeto que lo necesite.

20 En un ejemplo, la administración del virus oncolítico para uso en la presente invención y divulgación provoca, estimula y/o reorienta una respuesta inmune. En particular, la administración induce una respuesta de células T o B protectora en el hospedante tratado, por ejemplo frente a dicho virus oncolítico o eventualmente frente al producto codificado por el gen o genes terapéuticos insertados en el genoma vírico, si lo hay. La respuesta T protectora puede estar mediada por células CD4+ o CD8+, o tanto CD4+ como CD8+. La respuesta de células B se puede medir mediante ELISA, y la respuesta de células T se puede evaluar mediante ensayos ELISpot e ICS de cualquier muestra (por ejemplo, sangre, órganos, tumores, etc.) recogida del animal o sujeto inmunizado.

25 En un ejemplo, la administración del virus oncolítico permite cambiar el microentorno tumoral con el objetivo de potenciar la actividad de células efectoras en el tumor, especialmente linfocitos T efectores, y/o promover el agotamiento de Treg por lo menos parcial. Las células infiltrantes del tumor se pueden identificar fácilmente, por ejemplo mediante ensayos de inmunotinción convencionales.

30 En un ejemplo, el método descrito en la presente memoria y el virus oncolítico o composición de la invención proporcionan una eficacia terapéutica mayor que la obtenida en las mismas condiciones con un virus oncolítico similar (sin el modulador de puntos de control inmunitario) o con el modulador de puntos de control inmunitarios ya sea individualmente o incluso en coadministración. En el contexto de la invención y divulgación, el método descrito en la presente memoria y el virus oncolítico o composición de la invención proporcionan por lo menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, o por lo menos 25% más eficacia terapéutica que el virus o el modulador de puntos de control inmunitarios solos o en coadministración. Una mayor eficacia terapéutica se evidenciaría como se describe anteriormente en relación con la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", con preferencia específica por una supervivencia más prolongada.

40 Los ejemplos de enfermedades proliferativas que se pueden tratar usando el virus oncolítico y la composición de la invención y divulgación, o los métodos descritos en la presente memoria, incluyen cáncer de huesos, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer del esófago, cáncer orofaríngeo, cáncer pulmonar, cáncer de la cabeza o cuello, cáncer de piel, melanoma, cáncer uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de próstata, linfoma, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, sarcoma de tejido blando, leucemias crónicas o agudas, cáncer de la vejiga, cáncer renal, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), glioma, etc. La presente invención y divulgación asimismo es útil para el tratamiento de cánceres metastásicos, especialmente cánceres metastásicos que expresan PD-L1 (Iwai et al., 2005, Int. Immunol. 17: 133-44). Los cánceres preferidos que se pueden tratar usando el virus oncolítico de la invención y divulgación incluyen cánceres típicamente sensibles a inmunoterapia. Los ejemplos no limitativos de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (por ejemplo cáncer pulmonar no microcítico) y cáncer hepático (por ejemplo, hepatocarcinoma).

50 Según un ejemplo ventajoso, especialmente cuando el virus oncolítico está armado con un gen suicida, la terapia con el virus oncolítico de la invención y divulgación, o métodos descritos en la presente memoria, puede comprender una etapa adicional en la que se administran al sujeto cantidades farmacéuticamente aceptables de un profármaco, ventajosamente un análogo de citosina, en particular 4-FC. A título de ilustración, es posible usar una dosis de 50 a 500 mg/kg/día, prefiriéndose una dosis de 200 mg/kg/día o de 100 mg/kg/día. Dentro del contexto de la presente invención y divulgación, el profármaco se administra según práctica estándar (por ejemplo, por boca, sistémicamente, etc.). Preferentemente, la administración tiene lugar tras la administración del virus oncolítico, preferentemente por lo menos 3 días, más preferentemente por lo menos 4 días, e incluso más preferentemente por lo menos 7 días después de la administración del virus. Se prefiere la vía oral. Es posible administrar una única dosis de profármaco, o dosis que se repiten durante un tiempo que es suficientemente prolongado para permitir que se produzca el metabolito tóxico dentro del organismo o célula hospedante.

65

El virus oncolítico y la composición de la invención y divulgación, o el método descrito en la presente memoria, se pueden asociar con una o más sustancias o terapias eficaces en la terapia contra el cáncer, y la presente divulgación asimismo se refiere a un método que comprende la etapa de suministrar al sujeto una terapia adicional contra el cáncer. En el contexto de la presente invención y divulgación, dicha terapia adicional contra el cáncer comprende cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, o una combinación de las mismas. Preferentemente, el método descrito en la presente memoria comprende la administración de una o más sustancias eficaces en la terapia contra el cáncer. Entre las sustancias farmacéuticas eficaces en la terapia contra el cáncer que se pueden usar en asociación o en combinación con el virus oncolítico y la composición de la invención y divulgación, o con el método descrito en la presente memoria, se pueden mencionar más específicamente:

- ✓ agentes alquilantes tales como, por ejemplo, mitomicina C, ciclofosfamida, busulfano, ifosfamida, isofosfamida, melfalano, hexametilmelamina, tiotepa, clorambucilo, o dacarbazina;
- ✓ antimetabolitos tales como, por ejemplo, gencitabina, capecitabina, 5-fluorouracilo, citarabina, 2-fluorodesoxicitidina, metotrexato, idatrexato, tomudex, o trimetrexato;
- ✓ inhibidores de topoisomerasa II, tales como, por ejemplo, doxorubicina, epirubicina, etopósido, tenipósido, o mitoxantrona;
- ✓ inhibidores de topoisomerasa I, tales como, por ejemplo, irinotecán (CPT-11), 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38), o topotecán;
- ✓ fármacos antimetabólicos, tales como, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vincristina o vinorelbina;
- ✓ derivados del platino, tales como, por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino, espiroplatino o carboplatino;
- ✓ inhibidores de receptores de tirosina cinasa, tales como sunitinib (Pfizer) y sorafenib (Bayer);
- ✓ anticuerpos antineoplásicos, en particular anticuerpos que afectan a la regulación de los receptores de la superficie celular, tales como trastuzumab, cetuximab, panitumumab, zalutumumab, nimotuzumab, matuzumab, bevacizumab y ranibizumab;
- ✓ inhibidores de EGFR (por Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico), tales como gefitinib, erlotinib y lapatinib; y
- ✓ agentes inmunomoduladores, tales como, por ejemplo, alfa-, beta- o gamma-interferón, interleucina (en particular IL-2, IL-6, IL-10 o IL-12), o factor de necrosis tumoral;

El virus oncolítico y composición de la invención y divulgación, o método descrito en la presente memoria, asimismo se pueden usar en asociación con radioterapia.

La presente divulgación asimismo proporciona kits que incluyen un recipiente diferente (por ejemplo, un vial estéril de vidrio o de plástico) para cada dosis de virus a administrar. Opcionalmente, el kit puede incluir un dispositivo para llevar a cabo la administración de los agentes activos. El kit asimismo puede incluir un folleto que incluye información relativa a las composiciones o componente individual y formas de dosificación en el kit.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la cantidad de mAb anti-PD-1 purificado, Fab y scFv producidos a partir de CEF infectados.

La figura 2 ilustra un análisis mediante electroforesis de mAb (Vacc.mAb) y scFv (Vacc.scFv) recombinantes purificados, así como J43 comercial (BioXCell), en condiciones reducidas (R) y no reducidas (NR).

La figura 3: Eficacia de replicación *in vitro* de los virus en LoVo infectadas a una MOI de 0.0001, 0.001 y 0.01 con los virus indicados en el día 5 tras la infección. Los valores se representan como media  $\pm$  SD de tres determinaciones individuales.

La figura 4 ilustra las secuencias de aminoácidos de las cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-PD1 expresados por el virus vaccinia oncolítico descrito en la presente memoria.

La figura 5 ilustra el análisis de inmunotransferencia del mAb y de Fab recombinantes segregados en sobrenadantes de cultivo celular obtenidos a partir de CEF infectados con WRTG18618, WRTG18619, WRTG18620 y WRTG18621. Como referencia, se usa J43 comercial; M representa marcadores de MW, y C, control negativo.

La figura 6 ilustra la concentración de J43 recombinante producido en el suero (figura 6A) y en homogeneizado tumoral (figura 6B) de ratones tratados con una única administración de WRTG18618 ( $10^7$  pfu) inyectado intratumoralmente (que resulta de la implantación subcutánea de tumores B16F10) o subcutáneamente (ratones sin tumores), o con una administración intratumoral de 1  $\mu$ g o 10  $\mu$ g de J43 comercial (Bioxcell). La concentración de J43 recombinante se midió mediante ELISA cuantitativo 1, 5 y 11 días después de la inyección.

### Ejemplos

Estos ejemplos ilustran el virus vaccinia oncolítico manipulado para expresar diversas formas de antiinhibidores de puntos de control inmunitarios. Se han demostrado en modelos de tumores de ratón pruebas preclínicas de los efectos beneficiosos de expresar bloqueantes de puntos de control inmunitarios a partir de vectores víricos. Esto implica el uso de i) anticuerpos específicos de células murinas antipuntos de control inmunitario, y ii) un poxvirus oncolítico capaz de infectar células murinas con una mayor eficacia.

Para seleccionar como diana el bloqueante de puntos de control inmunitarios PD-1 murino (mPD-1), se escogió el anticuerpo J43 de hámster específico de células murinas. Se mostró que este anticuerpo bloquea la interacción de mPD1 con PD-L1 (patente US 7,858,746). El anticuerpo J43, y su control de isotipo (IgG de hámster) están disponibles en BioXCell. Los anticuerpos anti mPD-1 y su control de isotipo se usaron para establecer ensayos funcionales y ELISA cuantitativo *in vitro*. Además, J43 y sus diversas formas se clonaron en un virus oncolítico y se ensayaron *in vivo* en modelos de animales con tumores.

El virus oncolítico escogido para estos estudios es una cepa Western Reserve (WR) del virus vaccinia (VV) defectuosa para timidina cinasa (TK<sup>-</sup>) (locus J2R) y RR<sup>-</sup> (locus I4L), que hace al virus no replicativo en células sanas (que no se dividen). Por el contrario, se supone que VV TK<sup>-</sup>RR<sup>-</sup> se replica selectiva y eficientemente en células tumorales.

Vectorización de moléculas anti mPD-1 en virus vaccinia VV TK<sup>-</sup>RR<sup>-</sup> oncolítico.

La cadena pesada de J43 mostró una homología elevada con la cadena pesada de IgG anti CD79b. De este modo, la secuencia retenida para la clonación de la cadena pesada fue la cadena variable de J43 y la cadena constante de anti CD79b. La cadena ligera de J43 se clonó con la secuencia señal procedente de la cadena ligera del anticuerpo anti CD79b. Las cadenas ligera y pesada se pusieron bajo el control de los promotores víricos pH5R o p7.5K, que dieron fortalezas ligeramente diferentes. Además de los constructos de anticuerpo "completos", se generaron derivados, respectivamente constructos de fragmentos de unión a antígeno (Fab) etiquetados con His, así como constructos de anticuerpo monocatenario (scFv) etiquetados con His. Asimismo se generaron dos formatos de constructo para Fab, dependiendo de las porciones de las cadenas ligera o pesada colocadas bajo cada promotor. Los cinco constructos se insertaron en la cadena principal de WR VV sin TK, RR. A continuación se resumen los constructos:

WRTG18618 (o mAb1) que corresponde a pH5R-HC - p7.5K-LC  
 WRTG18619 (o mAb2) que corresponde a pH5R-LC - p7.5K-HC  
 WRTG18621 (o Fab1) que corresponde a pH5R-(VH-CH1-6His) - p7.5K-LC  
 WRTG18620 (o Fab2) que corresponde a pH5R-LC - p7.5K-(VH-CH1-6His)  
 WRTG18616 (scFv) que corresponde a pH5R-VH-gs-VL-6His).

HC y LC representan las abreviaturas de cadenas pesada y ligera, VH y VL, las de los dominios variables pesado y ligero, 6His, la de la etiqueta de HIS (6 histidinas), y gs (enlazador de poli-glicina-serina)

El constructo 1 demostró el mayor nivel de expresión del mAb o de Fab recombinantes, con los perfiles de ensamblaje de cadenas esperados.

Los lotes de virus WRTG18616 (scFv), WRTG18618 (mAb1) y WRTG18621 (Fab1) se produjeron en células BHK-21, y se purificaron mediante filtración de flujo tangencial (TFF).

#### Construcción de WRTG18618 (pH5R-HC-p7.5K-LC): mAb1

El fragmento que contiene HC seguido del promotor p7.5K se generó de forma sintética (Geneart: Regensburg, Alemania), y se clonó en el plásmido de transferencia del virus vaccinia pTG18496 restringido mediante *Pst*I y *Eco*RI, para dar pTG18614. El fragmento que contiene LC se generó de forma sintética, y se clonó en pTG18614 restringido mediante *Nsi*I y *Sa*II, para dar pTG18618.

El plásmido de transferencia del virus vaccinia, pTG18496, se diseña para permitir la inserción de la secuencia nucleotídica a transferir mediante recombinación homóloga en el gen TK del genoma del VV. Contiene las secuencias de flaqueo (BRGTK y BRDTK) que rodean al gen J2R, y el promotor pH5R seguido de múltiples sitios de clonación.

Las secuencias de aminoácidos de la HC y LC anti-PD-1 se dan en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, y en la figura 4.

5 La generación de WRTG18618 se llevó a cabo mediante recombinación homóloga en fibroblastos de embriones de pollo primarios (CEF) infectados con una WR sin RR, y transfectados mediante nucleofección con pTG18618 (según la tecnología Nucleofector de Amaxa). La selección vírica se llevó a cabo mediante purificación en placa tras el crecimiento en células 143B deficientes en timidina cinasa (TK<sup>-</sup>) cultivadas en presencia de bromodesoxiuridina. Esta selección permite que solamente TK<sup>-</sup> rWR sean viables. La ausencia de contaminación  
10 mediante WR progenitora se verificó mediante PCR.

Construcción de WRTG18619 (pH5R-LC-p7.5K-HC): mAb2

15 El fragmento que contiene LC seguido del promotor p7.5K se generó de forma sintética, y se clonó en el plásmido de transferencia del virus vaccinia pTG18496 restringido mediante *Pst*I y *Eco*RI, para dar pTG18615. El fragmento que contiene HC se generó de forma sintética, y se clonó en pTG18615 restringido mediante *Nsi*I y *Mlu*I, para dar pTG18619.

20 La generación del virus WRTG18619 se llevó a cabo mediante recombinación homóloga en CEF como se describió anteriormente.

Construcción de WRTG18621 (pH5R-(VH-CH1-6His)-p7.5K-LC): Fab1

25 El fragmento que contiene VH-CH1-6His seguido del promotor p7.5K se generó de forma sintética, y se clonó en el plásmido de transferencia del virus vaccinia pTG18496 restringido mediante *Pst*I y *Eco*RI, para dar pTG18617. El fragmento que contiene LC se generó de forma sintética, y se clonó en pTG18617 restringido mediante *Nsi*I y *Sal*I, para dar pTG18621.

30 La generación del virus WRTG18621 se llevó a cabo mediante recombinación homóloga en CEF como se describió anteriormente.

Construcción de WRTG18620 (pH5R-LC-p7.5K-(VH-CH1-6His): Fab2

35 El fragmento que contiene LC seguido del promotor p7.5K se generó de forma sintética, y se clonó en el plásmido de transferencia del virus vaccinia pTG18496 restringido mediante *Pst*I y *Eco*RI, para dar pTG18615. El fragmento que contiene VH-CH1-6His se generó de forma sintética, y se clonó en pTG18615 restringido mediante *Nsi*I y *Mlu*I, para dar pTG18620.

40 La generación del virus WRTG18620 se llevó a cabo mediante recombinación homóloga en CEF como se describió anteriormente.

Construcción de WRTG18616 (pH5R-VH-gs-VL-6His): scFv

45 El fragmento que contiene VH-gs-VL-6His se generó de forma sintética, y se clonó en el plásmido de transferencia del virus vaccinia pTG18496 restringido mediante *Pst*I y *Eco*RI, para dar pTG18616.

La generación del virus WRTG18616 se llevó a cabo mediante recombinación homóloga en CEF como se describió anteriormente.

50 Caracterización *in vitro* de los anticuerpos codificados anti-PD-1

Los vectores oncolíticos recombinantes descritos anteriormente se ensayaron para evaluar la producción de las moléculas codificadas anti-mPD-1. Para esto, se infectaron células primarias o estirpes celulares permisivas, y se recogió el sobrenadante. La presencia de moléculas anti-mPD-1 se puede determinar mediante SDS-PAGE,  
55 análisis de transferencia Western, análisis de espectrometría de masas, ELISA y análisis funcionales. Como controles, se usaron anticuerpos anti-mPD-1 comercialmente disponibles.

Los sobrenadantes procedentes de CEF infectados (moi 0.2) se analizaron (tras 48 y 72 h después de la infección) mediante transferencia Western en condiciones no reductoras usando para la detección un anticuerpo policlonal  
60 anti-IgG de hámster. WRTG18618 (mAb1) y WRTG18621 (Fab1) se pudieron detectar mediante ELISA. El perfil de expresión del producto segregado por células infectadas con WRTG18618 tiene un patrón similar al anticuerpo J43 comercial, y se observó un ensamblaje esperado del producto segregado por células infectadas por WRTG18621. Asimismo se detectó la expresión de scFv en el sobrenadante de cultivo mediante transferencia Western, en el tamaño esperado.

65

Purificación de mAb y evaluación in vitro de anticuerpos anti-PD-1

Se cultivaron CEF en matraces F175, y se infectaron con  $2.7 \times 10^8$  pfu de virus que expresan anti-PD-1. Tras 48-72 h, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y se sometieron a filtración en filtros de  $0.2 \mu\text{m}$ . mAb1 se purificó mediante proteína A Hitrap (GE Healthcare), seguido de la filtración en gel Superdex 200 (GE Healthcare), mientras que Fab1 y scFv se purificaron mediante HIS-Trap (GE Healthcare), seguido de la filtración en gel Superdex 75 (GE Healthcare). scFv eluyó de la filtración en gel en dos picos, correspondiendo el primero a dímeros, y el segundo, a monómeros. Se produjeron cantidades significativas de mAbs, Fab y scFv, como se muestra en la figura 1. El rendimiento está entre 0,5 y 2  $\mu\text{g/ml}$  de sobrenadante según el formato del anticuerpo.

El mAb purificado recombinante tuvo un perfil de electroforesis similar a los mAb comerciales con el ensamblaje correcto de las dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas en condiciones no reductoras y la detección de las cadenas ligera y pesada individuales en condiciones reductoras como se ilustra en la figura 2. Además, scFv purificado migró en SDS-PAGE en el tamaño esperado (véase la figura 2).

Los productos recombinantes se pueden detectar mediante ELISA, y son funcionales en un ELISA de competición (es decir, que bloquean la unión de PD-L1 de ratón, a  $0.2 \mu\text{g/ml}$ , a PD-1 de ratón revestido a  $1 \mu\text{g/ml}$ ), siendo mAb más eficiente que Fab en este experimento de competición. Además, el mAb1 recombinante es más eficiente que su equivalente J43 comercial, así como asimismo la fracción dimerica de scFv producida por VV es más eficiente que la monomérica, con una diferencia de aproximadamente 1 log en EC50.

La capacidad de mAb1, Fab1 y scFv codificados por VV para interactuar con PD-1 de la superficie celular se estudió en ensayos de unión basados en citometría de flujo usando las estirpes celulares de linfoma T positivas a PD-1 EL4 y RMA. Se incubaron  $10^5$  células EL4 o RMA durante 45 min. en hielo con  $100 \mu\text{l}$  de mAb1 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), anticuerpo J43 anti-mPD-1 comercialmente disponible ( $5 \mu\text{g/ml}$ , BioXCell), o IgG de hámster como control negativo ( $5 \mu\text{g/ml}$ , BioXCell), y se lavaron. La unión a PD-1 se detectó incubando las células durante 45 min. en hielo con  $100 \mu\text{l}$  de  $10 \mu\text{g/ml}$  de cóctel de anticuerpos anti-armenio + sirio de ratón monoclonal conjugados con FITC (BD Pharmingen). Tras el lavado, se midió la intensidad de la fluorescencia en un citómetro de flujo Navios™ (Beckman Coulter). Los datos se analizaron usando el software Kaluza 1.2 (Beckman Coulter). mAb1 codificado por WRTG18618 se unió eficientemente a células EL4 y RMA.

Para medir la unión de Fab1 y scFv, se tiñeron indirectamente  $5 \times 10^5$  células EL4 o RMA con  $5 \mu\text{g/ml}$  de Fab1 o  $2.5 \mu\text{g/ml}$  de scFv monomérico (que están ambos etiquetados con His), seguido del anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con PE anti-etiqueta de His (diluido 1/10, Miltenyi Biotec), y se analizaron como se describió anteriormente. Se mostró que Fab1 y scFv monomérico, producidos a partir de WRTG18621 y WRTG18616, se unen eficientemente a la superficie de células EL4 y RMA. La unión específica se pudo demostrar incubando células EL4 con Fab1 o con scFv monomérico y J43 de longitud completa o IgG de hámster como control negativo de BioXCell, seguido de la tinción con el anticuerpo conjugado con PE anti-etiqueta de His. La tinción de EL4 se redujo en presencia de J43 de longitud completa, pero no con IgG de hámster como control negativo. En conjunto, los resultados demostraron que mAb1, Fab1 y scFv codificados por VV fueron capaces de reconocer en dos estirpes celulares de linfocitos T murinas PD-1 expresada endógenamente.

Se estableció un ensayo de competición basado en citometría de flujo para comparar la actividad bloqueante de moléculas anti-mPD-1. El ensayo se basa en la estirpe celular de linfoma T murina EL4, que es muy positiva a PD-1. La unión de mPD-L1-hFc (Ligando 1 de PD murina, que comprende el fragmento de Fc de IgG humano) a la PD1 de la superficie celular se puede detectar mediante citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal marcado con PE anti-hFc. La unión de mPD-L1-hFc puede entrar en competencia con anticuerpos anti-PD-1, conduciendo a una reducción de la señal de PE unida a las células.

Se evaluó la actividad inhibidora de mAb1, Fab1 y scFv recombinantes sobre la unión de PD-L1 a células EL4, y se comparó con el anticuerpo J43 anti-PD-1 comercialmente disponible (BioXCell). Más específicamente, se coinubaron  $10^5$  células EL4 con  $2 \mu\text{g/ml}$  de mPD-L1 hFc (R&D Systems) y concentraciones crecientes de los diversos anticuerpos anti-PD-1 en  $100 \mu\text{l}$  durante 45 min. en hielo. Tras el lavado, las células se incubaron con  $100 \mu\text{l}$  de anticuerpo anti-Fc de IgG humano de ratón conjugado con PE  $5 \mu\text{g/ml}$  (BioLegend) durante 45 min. en hielo. Las células se lavaron, y la intensidad media de la fluorescencia se midió como se describió anteriormente. En estas condiciones, el clon J43 de control anti mPD-1 mostró una  $\text{IC}_{50}$  de  $1.6 \mu\text{g/ml}$ .

Como se esperaba, la IgG de hámster de control no mostró ninguna actividad de bloqueo sobre la unión de PD-L1 a células EL4. Los mAb1, Fab1, scFv monomérico y dimerico recombinantes, producidos respectivamente a partir de WRTG18618, WRTG18621 y WRTG18616, fueron capaces de bloquear la unión del ligando al receptor de la superficie celular como J43 de BioXCell. De forma importante, mAb1 codificado por WRTG18618 mostró en este ensayo una mejor actividad de bloqueo en comparación con J43 de BioXCell y las versiones Fab1 y scFv.

Se estableció un ELISA cuantitativo para cuantificar concentraciones de anticuerpos producidas en suero de ratón o mediante células infectadas con WR recombinante, usando anticuerpos revestidos anti-hámster derivados de

conejo para capturar J43, que se pudo detectar a su vez con anticuerpo anti-hámster derivado de cabra. El ensayo es sensible a suero de ratón, y se han de generar curvas patrón en presencia de suero de ratón al 50%.

#### Ensayo de citotoxicidad *in vitro* (actividad oncolítica)

5 La estirpe celular de cáncer de colon LoVo humana se transdujo en suspensión a una MOI de 0.001 y 0.0001 mediante el virus vaccinia WR sin TK ni RR sin transgén (WRTG18011), y mediante el virus vaccinia WR sin TK ni RR que expresa las diferentes moléculas anti mPD-1 (WRTG18616, WRTG18618 y WRTG8621). Se colocó en  
10 placas un total de  $3 \times 10^5$  células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos en 2 ml de medio suplementado con 10% de FCS. Las células se cultivaron entonces a 37°C, y la supervivencia celular se determinó 5 días más tarde mediante exclusión con azul de tripán. Como se muestra en la figura 3, la actividad oncolítica de los diferentes virus dio como resultado una reducción de 75-95% y de 99% en el número de células viables a una MOI de 0.0001 y 0.001, respectivamente. El virus WR sin TK ni RR sin transgén, y el virus WR sin TK ni RR que expresa las  
15 diferentes moléculas anti mPD-1, no mostraron diferencia en cuanto a la citotoxicidad. De este modo, la expresión de las diferentes moléculas anti mPD-1 no afectó a la actividad oncolítica del virus vaccinia.

#### Diseño óptimo para la expresión de anticuerpos

20 Los vectores oncolíticos recombinantes se estudiaron mediante inmunotransferencia para evaluar los niveles de expresión y el ensamblaje de los anticuerpos segregados. Los análisis de inmunotransferencia se llevaron a cabo en sobrenadantes de cultivo celular recogidos 24 h tras la infección de los CEF con los constructos de mAb y Fab descritos anteriormente. Los sobrenadantes se centrifugaron 5 min. a 16000 g, y se prepararon 25  $\mu$ l en amortiguador de Laemmli sin agente reductor, y se cargaron en gel de poliacrilamida al 4-15% PrecastGel (Biorad). Como molécula de referencia, se usó J43 comercial monoclonal (BioXcell). Se cargó en el gel un  $\mu$ g de cada  
25 molécula. La electroforesis en gel se llevó a cabo en condiciones no reductoras, para preservar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada y permitir una detección óptima (es decir, el anticuerpo policlonal usado para la detección no reconoció las cadenas reducidas de IgG ni de Fab). Las proteínas se transfirieron entonces sobre una membrana de PVDF usando el sistema Trans-blot Turbo (Transblot Turbo Transfer pack Biorad) con el protocolo previamente programado (MW elevado: 10 min.; 2.5 A constante; hasta 25V). Las membranas se saturaron toda la noche a 4°C en disolución de bloqueo (NaPO<sub>4</sub> 8mM, KPO<sub>4</sub> 2mM, NaCl 154 mM, pH 7.2 (PBS), suplementado con 0.05% de Tween20, 5% de leche seca desnatada Biorad). Para la inmunodetección de los anticuerpos, se usó anticuerpo de cabra anti-IgG de hámster armenio conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson Immunoresearch) a 80 ng/ml en amortiguador de dilución (PBS, 0.05% de Tween20, 0.5% de  
30 leche seca desnatada). El desarrollo se llevó a cabo con reactivos de detección de Amersham ECL Prime Western Blotting, y para capturar la quimioluminiscencia, se usó Molecular Imager ChemiDOC™ XRS.

Como se ilustra en la figura 5, tanto WRTG18618 como WRTG18619 apenas segregaron las mismas cantidades de un producto de anticuerpo con un tamaño aparente que corresponde a dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras enlazadas juntas de forma comparable a las de mAb J43 comercial. Sin embargo, WRTG18619 asimismo produjo un producto no esperado que migra entre marcadores de 43 y 55 kDa (ver la banda extra indicada por una  
40 flecha en la cuarta línea "18619"). De forma similar, asimismo había una banda extra en el sobrenadante de cultivo infectado con WRTG18620 (misma posición y misma intensidad en la quinta línea "18620"), mientras que WRTG18621 produjo una cantidad elevada de Fab correctamente ensamblado sin ningún producto mal ensamblado detectable (véase la punta de flecha en la sexta línea "18621").

45 Los análisis de los sobrenadantes de cultivo celular generados tras la infección de estirpes celulares de mamífero BHK21 y A549 generaron el mismo perfil (datos no mostrados).

50 Cuando se observa el diseño de los constructos, parece que en los constructos tanto de WRTG18619 como de WRTG18620, la cadena ligera del anticuerpo se colocó bajo el control transcripcional del promotor pH5R (un promotor potente). Una hipótesis es que, en esta configuración, las cadenas ligeras del anticuerpo podrían estar sobreexpresadas con respecto a las cadenas pesadas, y de este modo se pueden ensamblar en homodímeros. Por lo tanto, esta banda extra, que migra entre 43 y 55 kDa, podría corresponder a cadenas ligeras sobreproducidas que se han ensamblado en un homodímero de una masa teórica de 47 kDa.

55 Por lo tanto, es preferible expresar la cadena pesada bajo el control de un promotor más potente que el usado para expresar las cadenas ligeras, a fin de reducir el riesgo de generar un ensamblaje aberrante (por ejemplo, homodímeros de cadenas ligeras)

60 Todos juntos, estos resultados confirmaron la capacidad de los virus oncolíticos recombinantes descritos en la presente memoria para segregar mAb y Fab en niveles detectables. WRTG18618 y WRTG18621 se seleccionaron para el resto de los experimentos, debido a su capacidad para producir productos de anticuerpo que están más próximos a las expectativas que aquellos de WRTG18619 y WRTG18620.

Expresión *in vivo* del anticuerpo vectorizado anti-PD1

La expresión del mAb J43 vectorizado anti-PD-1 se evaluó *in vivo* en ratones con y sin tumores B16F10 implantados subcutáneamente. WRTG18618 (constructo de mAb1) se inyectó intratumoralmente o subcutáneamente, y se comparó con J43 comercial (inyección intratumoral).

Experimentos *in vivo* y recogida de muestras

Más específicamente, se inyectaron subcutáneamente (S.C.)  $3 \times 10^5$  células B16F10 (melanoma murino) en los flancos derechos de ratones C57BL/6 hembras de seis semanas. En el día 0 (D0), cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 100-200 mm<sup>3</sup>, se inyectaron intratumoralmente (I.T.) 100 microlitros de WRTG18618 ( $10^7$  pfu) o J43 comercial (1 µg o 10 µg, Bioxcell).

Asimismo se inyectó S.C. WRTG18618 en ratones sin tumor.

Se recogieron sangre y tumores en el D1, D5 y D11. Para cada punto de tiempo, 3 ratones se anestesiaron con 200 µl de pentobarbital, y la sangre se recogió mediante punción intracardíaca. La sangre se almacenó a 4°C durante 8 horas, y el suero se recuperó tras dos centrifugaciones y se mantuvo a -20°C hasta el análisis. Tras la recogida de muestras de sangre, los ratones se sacrificaron mediante alargamiento cervical, y se recuperó el tumor. Los tumores se pesaron, se cortaron en pequeños trozos, y se transfirieron a tubos de tipo GentleMACS C (Miltenyi) que contienen 3 ml de PBS. Los tumores se disociaron mecánicamente aplicando el programa "m-impumor01" (GentleMacs, Miltenyi). Tras la centrifugación a 300 g durante 7 min., los sobrenadantes se recuperaron y se mantuvieron a -20°C hasta el análisis.

La concentración de J43 se midió mediante ELISA cuantitativo tanto en suero como en homogeneizados tumorales en diferentes puntos de tiempo tras las inyecciones de mAb J43 comercial o de virus.

ELISA cuantitativo

Las concentraciones de J43 se evaluaron tanto en suero como en homogeneizados tumorales. Más específicamente, se incubaron placas de noventa y seis pocillos (placa inmune Nunc Maxisorp) toda la noche a 4°C con 100 µl/pocillo de 0.8 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-IgG de hámster (Southern Biotech) en disolución de revestimiento (carbonato de Na 0.05M, pH 9.6, Sigma). Las placas se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (300 µl/pocillo de PBS, 0.05% de Tween 20), y se incubaron 1 h a RT con 200 µl/pocillo de disolución de bloqueo (PBS, 0.05% de Tween 20, 5% de leche seca desnatada). Las placas se lavaron tres veces con amortiguador de lavado. Se preparó un intervalo de patrones de J43 (BioXcell) en suero de ratón al 100% (Sigma) desde 1000 a 0.488 ng/ml mediante diluciones en serie de 2 veces. Cada patrón se diluyó entonces adicionalmente 2 veces en disolución de bloqueo (concentración final de J43 desde 500 hasta 0.244 ng/ml), para obtener una concentración final de suero de 50%. Se añadieron por duplicado en la placa cien µl/pocillo de cada patrón. Las muestras de suero se diluyeron por lo menos dos veces en disolución de bloqueo/suero, y se añadieron 100 µl a las placas. Las placas se incubaron 2 h a 37°C. Después de 3 lavados con amortiguador de lavado, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra conjugado con HRP anti-IgG de hámster armenio (Jackson Immunoresearch), a 80 ng/ml, y las placas se incubaron 1 h a 37°C. Después de 3 lavados, se añadieron 100 µl/pocillo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB, Sigma), y las placas se incubaron a RT durante 30 min. La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M, y la absorbancia se midió a 450 nm con un lector de placas (TECAN Infinite M200 PRO). Los valores de la OD obtenidos se transfirieron al software GraphPadPrism, y las concentraciones de las muestras se calcularon usando la curva patrón ajustada con 5 parámetros.

Como se muestra en la figura 6A, cuando se inyecta subcutáneamente en ratones sin tratamiento previo (sin tumores implantados), la producción de J43 recombinante a partir de WRTG18618 fue muy débil (9 ng/ml en el día 1, y 4.5 ng/ml en el día 5). Por el contrario, se segregaron cantidades elevadas de J43 recombinante en suero de ratones que poseen tumores B16F10 tras la inyección intratumoral de WRTG18618, respectivamente 9 y 1900 veces mayor en el D1 y D5 (83 ng/ml y 9500 ng/ml) que la concentración de J43 recombinante medida tras la inyección subcutánea del virus. Este resultado sugiere que el virus oncolítico se multiplica preferentemente en tumores en vez de en tejidos sanos subcutáneos. En comparación, las concentraciones séricas encontradas tras la inyección intratumoral de 10 µg de J43 comercial ascendieron a alrededor de 1000 ng/ml (1306 ng/ml en el D1 y 1049 ng/ml en el D5), mientras que las concentraciones séricas fueron mucho menores con 1 µg de J43 comercial (73 ng/ml en el D1 y 35 ng/ml en el D5).

En homogeneizados tumorales, la producción de J43 recombinante siguió la misma tendencia como en el suero, con un pico de concentración en el D5 (ver la figura 6B). Las farmacocinéticas de J43 tras una única inyección IT de mAb comercial o de WRTG18618 son muy diferentes. Tras la inyección IT de 10 µg de J43 comercial, la concentración de anticuerpo máxima se midió en suero y en tumor en el D1 (1306 ng/ml y 173 ng/ml respectivamente) según lo esperado, mientras que la inyección IT de WRTG18618 dio como resultado

5 concentraciones séricas y tumorales máximas en el D5 (9500 ng/ml y 3800 ng/ml, respectivamente). Se debería de destacar que las concentraciones tumorales de J43 recombinante producido tras la inyección IT del virus fueron mucho mayores que las medidas tras la inyección IT de 10 µg de J43 comercial en todos los puntos de tiempo (410 ng/ml frente a 173 ng/ml en el D1; 3800 ng/ml frente a 51 ng/ml en el D5; y 700 ng/ml frente a una cantidad por debajo del límite de detección en el D11). De forma importante, la producción de anticuerpo todavía se detectó en tumores en el D11 tras el tratamiento con el virus, lo que no es el caso tras la inyección de J43 comercial.

10 Estos datos sugieren que la vectorización de J43 en virus oncolíticos permite una mayor acumulación y más prolongada de anticuerpo en tumores, en comparación con la inyección IT de anticuerpo comercial.

#### 10 Actividad antitumoral en modelo de tumor subcutáneo

15 La actividad antitumoral de los diversos virus vaccinia que expresan anti-PD-1 descritos anteriormente se puede evaluar en modelos preclínicos convencionales tras el implante de tumores, seguido de la inyección de los constructos. Por ejemplo, se inyectan subcutáneamente células cancerosas murinas en los flancos de ratones inmunocompetentes. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-70 mm<sup>3</sup>, los ratones se distribuyeron al azar de manera enmascarada, y se trataron con el virus vaccinia indicado a una dosis de 1x10<sup>7</sup> PFU. Los vectores o el vehículo de control (amortiguador usado para resuspender el virus) se inyectan directamente en el tumor en los días 10, 12 y 14 tras el implante del tumor. El tamaño tumoral se mide dos veces a la semana usando calibradores. En particular, los anticuerpos scFv y mAb1 vectorizados son por lo menos tan eficientes como la coadministración de un vector WR con J43 comercial a la hora de retrasar el crecimiento tumoral e incrementar la tasa de supervivencia.

20 Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de averiguar usando una experimentación no más allá de la habitual, numerosos equivalentes al método específico y reactivos descritos en la presente memoria, incluyendo alternativas, variantes, adiciones, supresiones, modificaciones y sustituciones. Se considera que tales equivalentes están comprendidos dentro del alcance de la presente divulgación

#### 30 **Listado de secuencias**

<110> Transgene SA SILVESTRE, Nathalie GEIST, Michel RITTNER, Karola MARCHAND, Jean-Baptiste THIOUDELLET, Christine

35 <120> Virus oncolítico para la expresión de moduladores de puntos de control inmunitarios

<130> B368022D35114

<150> EP14306153.9

<151> 2014-07-16

40 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 478

<212> PRT

<213> secuencia artificial

50 <220>

<223> secuencia de aminoácidos para cadena pesada anti PD-1

<400> 1

ES 2 743 873 T3

Met Gly Leu Gly Leu Gln Trp Val Phe Phe Val Ala Leu Leu Lys Gly  
 1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys  
 20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

Ser Asp Tyr Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Ala His Ile Tyr Thr Lys Ser Tyr Asn Tyr Ala Thr Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Ser Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
 85 90 95

Arg Ser Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Thr Glu Asp Thr  
 100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Thr Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Leu Asp  
 115 120 125

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Thr Thr Thr



ES 2 743 873 T3

Glu Gln Thr Val Lys Lys Asp Val Ser Val Thr Cys Leu Val Thr Gly  
385 390 395 400

Phe Leu Pro Gln Asp Ile His Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
405 410 415

Gln Pro Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Val Leu Asp Ser Asp  
420 425 430

Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Pro Lys Ser Arg Trp  
435 440 445

Asp Gln Gly Asp Ser Phe Thr Cys Ser Val Ile His Glu Ala Leu His  
450 455 460

Asn His His Met Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Asn  
465 470 475

<210> 2

<211> 233

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de aminoácidos para cadena ligera anti PD1

<400> 2

Met Ala Trp Thr Pro Gly Ile Phe Met Val Leu Ser Tyr Leu Thr Gly  
1 5 10 15

Ser Phe Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Val Asn Val  
20 25 30

Gly Glu Thr Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Tyr  
35 40 45

Phe Ala Asp Trp Phe His Gln Arg Ser Asp Gln Thr Ile Leu Gln Val  
50 55 60

Ile Tyr Asp Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Ile Ser  
65 70 75 80

Gly Ser Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Arg Asp Val Arg  
85 90 95

Ala Glu Asp Glu Gly Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Gly Tyr Val Asp Ser  
100 105 110

Asp Ser Lys Leu Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu

ES 2 743 873 T3

	115						120								125				
Gly	Gly	Pro	Lys	Ser	Ser	Pro	Lys	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Pro	Ser	Pro				
	130						135				140								
Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Val	Asn	Asp				
145					150					155					160				
Phe	Tyr	Pro	Gly	Ser	Ala	Thr	Val	Thr	Trp	Lys	Ala	Asn	Gly	Ala	Thr				
				165					170						175				
Ile	Asn	Asp	Gly	Val	Lys	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Gly	Gln	Asn				
			180					185						190					
Tyr	Met	Thr	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Ala	Asp	Gln	Trp	Lys	Ser				
		195					200						205						
His	Asn	Arg	Val	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Glu	Thr	Val	Glu				
	210					215					220								
Lys	Ser	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu	Cys	Leu											
225					230														

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Virus oncolítico que comprende insertado en su genoma una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más moduladores de punto de control inmunitario, en el que dicho virus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico defectuoso para la actividad de ribonucleótido reductasa (RR) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen vírico I4L.
- 10 2. Virus oncolítico según la reivindicación 1, en el que dicho virus vaccinia oncolítico se selecciona de entre el grupo de cepas Elstree, Wyeth, Copenhagen y Western Reserve.
- 15 3. Virus oncolítico según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho virus vaccinia oncolítico es defectuoso para la timidina cinasa (TK) que resulta de mutaciones inactivantes en el gen vírico J2R.
- 20 4. Virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho virus vaccinia oncolítico comprende además por lo menos un gen terapéutico insertado en el genoma vírico, preferentemente dicho gen terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en genes que codifican productos de gen suicida y genes que codifican proteínas inmunoestimulantes.
- 25 5. Virus oncolítico según la reivindicación 4, en el que dicho gen suicida se selecciona de entre el grupo que consiste en genes que codifican una proteína que presenta una actividad de citosina desaminasa (CDasa), una actividad de timidina cinasa, una actividad de uracilo fosforribosil transferasa (UPRTasa), una actividad de purina nucleósido fosforilasa y una actividad de timidilato cinasa.
- 30 6. Virus oncolítico según la reivindicación 5, en el que dicho producto de gen suicida presenta actividades de CDasa y UPRTasa, y preferentemente se selecciona de entre el grupo que consiste en los polipéptidos codA::upp, FCY1::FUR1 y FCY1::FUR1[Delta] 105 (FCU1) y FCU1-8.
- 35 7. Virus oncolítico según la reivindicación 5 o 6, en el que dicho virus oncolítico es un virus vaccinia defectuoso para las actividades tanto de TK como de RR y que comprende insertado en su genoma el gen suicida terapéutico FCU1.
- 40 8. Virus oncolítico según la reivindicación 4, en el que dicha proteína inmunoestimulante es una interleucina o un factor estimulante de colonias, con una preferencia específica por GM-CSF.
- 45 9. Virus oncolítico según la reivindicación 8, en el que dicho virus oncolítico es un virus vaccinia defectuoso para la actividad de TK y que comprende insertado en su genoma el GM-CSF humano terapéutico.
- 50 10. Virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichos uno o más moduladores de punto de control inmunitario se seleccionan de entre el grupo que consiste en ligandos peptídicos, dominios solubles de receptores naturales, ARNi, moléculas antisentido, anticuerpos y andamiajes proteínicos,
- 55 y en el que dichos uno o más moduladores de punto de control inmunitario antagonizan por lo menos parcialmente la actividad de punto(s) de control inmunitario(s) inhibidor(es), en particular los mediados por cualquiera de los siguientes PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG3, Tim3, BTLA y CTLA4.
- 60 11. Virus oncolítico según la reivindicación 10, en el que dichos uno o más moduladores de punto de control inmunitario comprenden:
- 65 a) un anticuerpo que se une específicamente a la PD-1 humana y en particular un anticuerpo anti-PD-1 seleccionado de entre el grupo que consiste en nivolumab, pembrolizumab y pidilizumab;
- b) un anticuerpo que se une específicamente al PD-L1 humano y en particular un anticuerpo anti-PD-L1 seleccionado de entre el grupo que consiste en MPDL3280A y BMS-936559; o
- c) un anticuerpo que se une específicamente a la CTLA-4 humana y en particular un anticuerpo anti-CTLA4 seleccionado de entre el grupo que consiste en ipilimumab, tremelimumab y anticuerpos anti-CTLA4 monocatenarios.
12. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende de aproximadamente  $10^7$  pfu a aproximadamente  $5 \times 10^9$  pfu de dicho virus oncolítico.
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 o 13 que se formula para la administración parenteral.

- 5 15. Virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para una utilización para tratar una enfermedad proliferativa, preferentemente un cáncer, y más preferentemente un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de hígado.
16. Virus oncolítico o composición farmacéutica para una utilización según la reivindicación 15, en el/la que dicho virus oncolítico se administra por vía intravenosa o intratumoral.
- 10 17. Virus oncolítico o composición farmacéutica para una utilización según la reivindicación 16, que comprende de 2 a 5 administraciones intravenosas o intratumorales de  $10^8$  o  $10^9$  pfu del virus vaccinia oncolítico a un intervalo de aproximadamente 1 o 2 semanas.
- 15 18. Virus oncolítico o composición farmacéutica para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que comprende además la administración de un profármaco y/o una sustancia eficaz en la terapia anticancerosa.

Figura 1

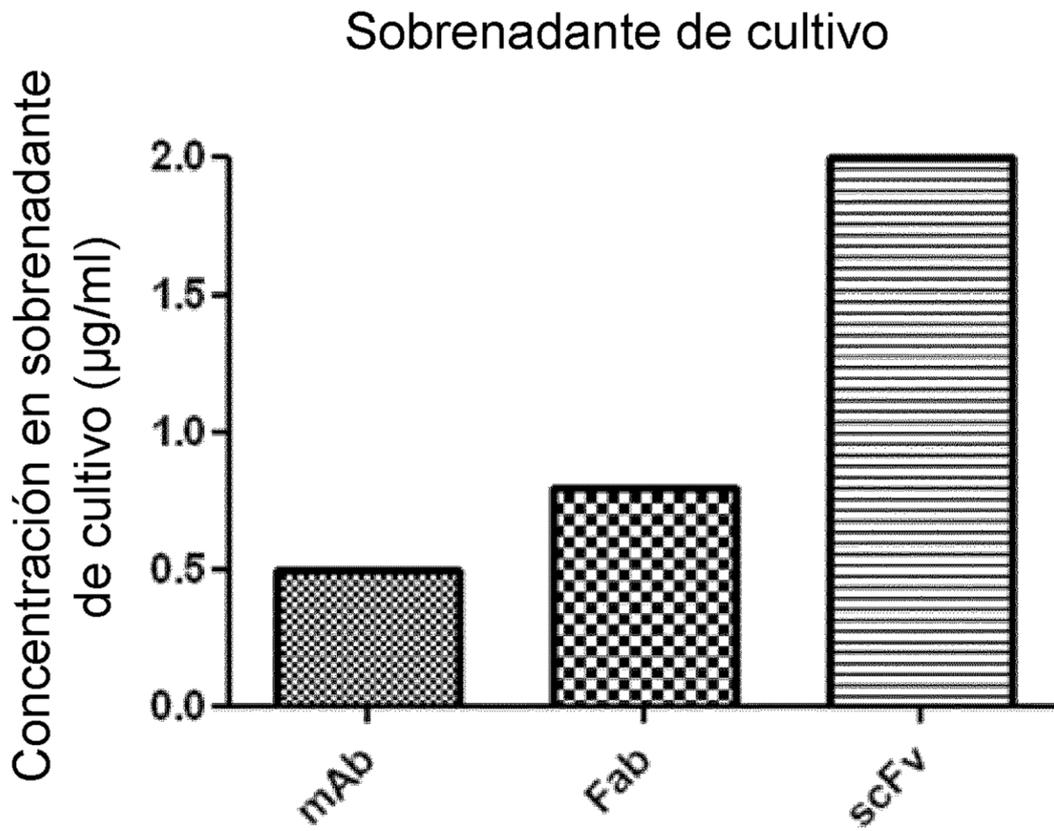
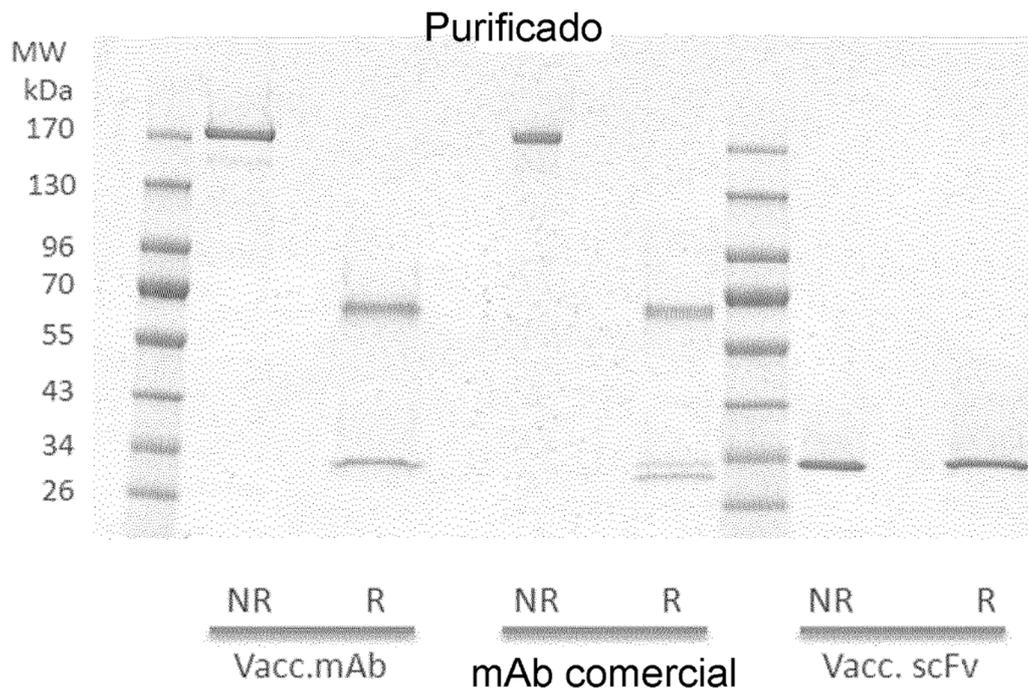


Figura 2



R : condición reducida

NR : condición no reducida

Figura 3

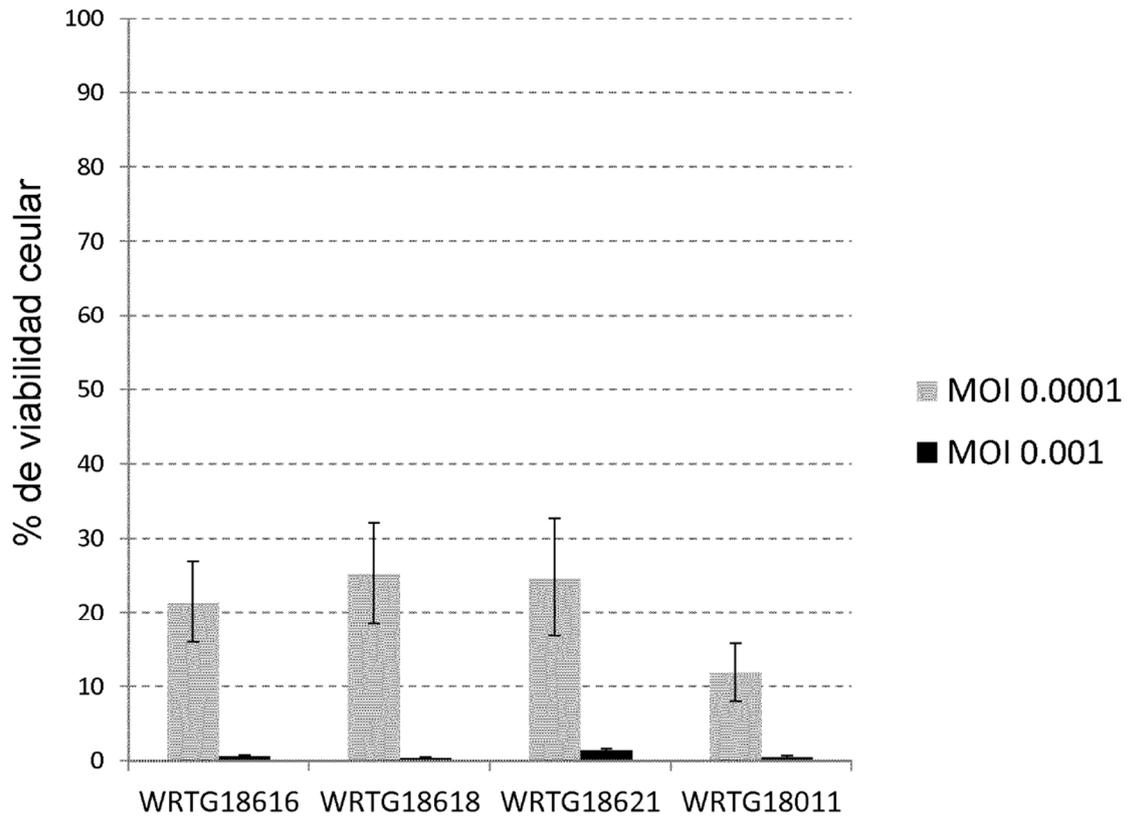


Figura 4

Secuencia de J43 de cadena pesada:

MGLGLQWVFFVALLKGVHCEVRLLES GGGLVKPEGSLKLSCVASGFTFSD  
YFMSWVRQAPGKLEWVAHIYTKSYNYATYYSGSVKGRFTISRDDSRSMV  
YLQMNNLRTE DTATYYCTRDGSGYPSLDFWGQGTQVTVSSATTTAPSVYP  
LAPACDSTTSTDTVTLGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPSVLH  
SGLYSLSSSVTPSSTWPKQPITCNVAHPASSTKVDKIEPRTD TDCPN  
PPDPCPTCPTDLLGGPSVFIFPPKPKDVLMI SLTPKITCVVVDVSEEEP  
DVQFNWYVNNVEDKTAQTETRQRQYNSTYRVVSVLPIKHQDWMSGKVFKC  
KVNNNALPSPIEKTISKPRGQVRVPQIYTFPPPIEQTVKKDVSVTCLVTG  
FLPQDIHVEWESNGQPQPEQNYKNTQPVLDS DGSYFLYSKLNVPKSRWDQ  
GDSFTCSVIHEALHNHHMTKISRSLGN

Secuencia de J43 de cadena ligera:

MAWTPGIFMVLSYLTGSFSYELTQPPSASVNVGETVKITCSGDQLPKYFA  
DWFHQRS DQTI LQVIYDDNKRPSGIPERISGSSSGTTATLTIRDVRAEDE  
GDYYCFSGYVDS SKLYVFGSGTQLTVLGGPKSSPKVTVFPPSPEELRTN  
KATLVCLVNDFYPGSATVTWKANGATINDGVKTTKPSKQGQNYMTSSYLS  
LTADQWKSHNRVSCQVTHEGETVEKSLSPA ECL

Figura 5

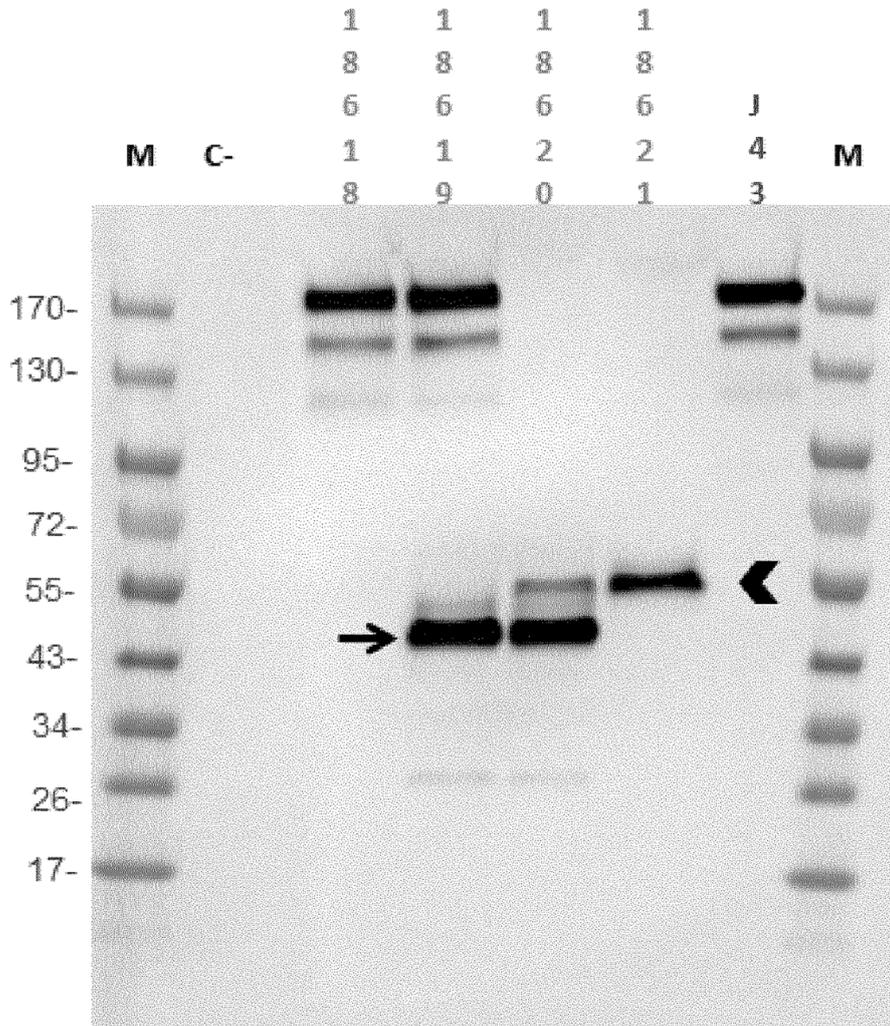


Figura 6A

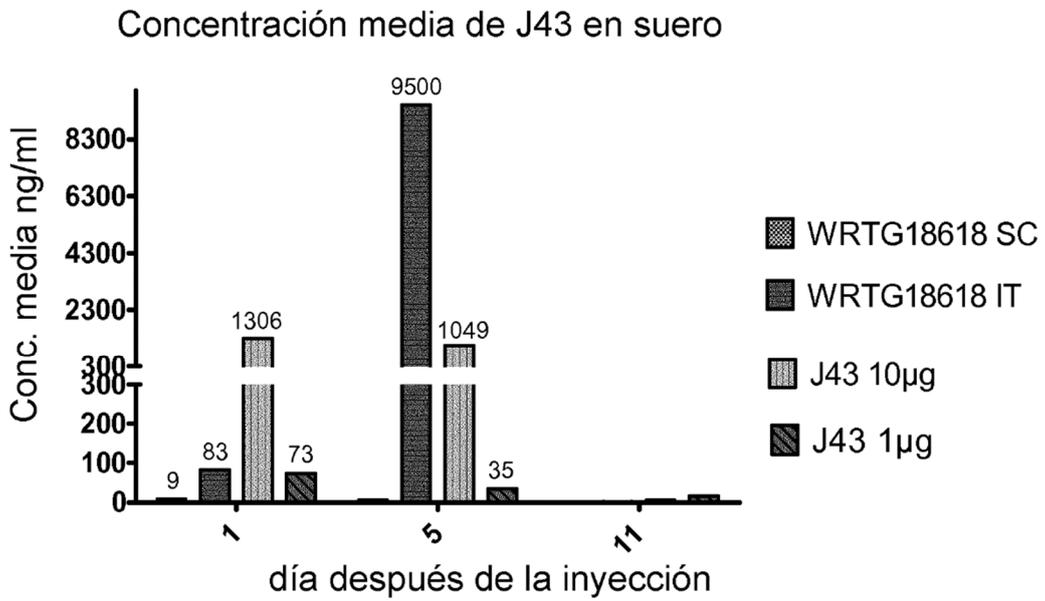


Figura 6B

