

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 952**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2016 PCT/GB2016/050973**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2016 WO16162675**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2016 E 16716896 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3280798**

54 Título: **Composiciones terapéuticas de uso para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

07.04.2015 GB 201505860

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

21.02.2020

73 Titular/es:

**AGALIMMUNE LIMITED (100.0%)
1st Floor Thavies Inn House, 3-4 Holborn Circus
London EC1N 2HA , GB**

72 Inventor/es:

**GALILI, URI;
WESTBY, MICHAEL y
SHAW, STEVEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 952 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

Composiciones terapéuticas de uso para el tratamiento del cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para tratar el cáncer. Más específicamente, la presente invención se refiere a composiciones de virus oncolíticos modificados genéticamente y su uso en el tratamiento del cáncer los cuales lisan específicamente células tumorales y dirigen activamente células tumorales y residuos celulares a células presentadoras de antígeno, con el fin de generar inmunidad antitumoral.

Antecedentes de la invención

- 10 Los tumores se pueden desarrollar en pacientes con cáncer porque el sistema inmunitario no detecta las células tumorales como células que deben destruirse. Las células tumorales expresan antígenos tumorales autólogos en una gran proporción de pacientes con cáncer. Estos antígenos tumorales autólogos, también llamados "neoantígenos", pueden provocar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora. Las células tumorales, o membranas de células tumorales, tienen que ser internalizadas por células presentadoras de antígeno para inducir el desarrollo de una
15 respuesta inmunitaria antitumoral. Sin embargo, el sistema inmunitario en muchos pacientes con cáncer muestra una "ignorancia" hacia los antígenos tumorales que se asocia con el desarrollo temprano del tumor de una manera "sigilosa", de modo que el tumor es efectivamente "invisible" a las células presentadoras de antígeno (Pardoll, 2000; Clin Immunol. 95: S44-49, y Dunn *et al.*, 2002; Nat Immunol; 3: 991-8).

- 20 Además, el microentorno del tumor y el entorno local de citoquinas son a menudo supresores de la función inmunitaria y pueden inducir activamente la anergia de las células inmunitarias y la muerte (Malmberg, Cancer Immunol Immunother., 53: 879-92; Lugade *et al.*; J Immunol. 2005; 174 : 7516-23 (2004); Schreiber *et al.*, Science (Nueva York, NY), 331 (6024), 1565-70 (2011)). El tratamiento efectivo de las lesiones tumorales requiere dos componentes: 1. Destrucción de las lesiones que son lo suficientemente grandes para ser detectadas visualmente o mediante
25 tecnología de imagen, y 2. Inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral protectora y sistémica contra antígenos tumorales. Dicha respuesta inmunitaria destruirá cualquier lesión no tratada (por ejemplo, aquellas a las que no se puede acceder por tratamiento ni extirpación mediante cirugía) y da como resultado la detección, regresión y/o destrucción mediada por inmunidad de las micrometástasis que no se pueden detectar visualmente y no son detectables mediante imágenes. A menudo, el tamaño de un tumor impide la eficacia de una respuesta inmunitaria antitumoral circulante de manera oportuna. La resección quirúrgica u otros medios, tal como la inyección intratumoral
30 de composiciones, a menudo son necesarias para reducir el tamaño de un tumor además de aprovechar una inmunidad antitumoral activa.

- Recientemente, se han desarrollado virus oncolíticos que son útiles para matar selectivamente células tumorales mediante la replicación lítica y, por lo tanto, reducir el tamaño del tumor (Liu *et al.*, World J Gastroenterol. 2013 Aug 21; 19 (31): 5138-43). Los virus útiles se inhabilitan de tal manera que ya no son patógenos, es decir, no se replican y destruyen las células no tumorales, pero sí pueden entrar en las células tumorales y matarlas. Se ha sugerido que un virus ejemplar, el virus del herpes simple (VHS), es útil para el tratamiento oncolítico del cáncer. Se han identificado
35 varias mutaciones de VHS que aún permiten que el virus se replique en cultivo o en células que se dividen activamente *in vivo* (p. ej., en tumores), pero que impiden una replicación significativa en el tejido normal.

- Se ha demostrado la promesa de varios virus adicionales, además del VHS, para el tratamiento oncolítico del cáncer. Se ha demostrado que el uso combinado de un VHS oncolítico con la administración del gen que codifica una proteína
40 inmunomoduladora, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), codificado en el genoma del virus desactivado, tiene propiedades de estimulación inmunitaria contra el tumor a tratar, particularmente después de la inactivación de las funciones virales que generalmente reducen las respuestas inmunitarias al VHS. Por lo tanto, en tal uso, un mutante oncolítico de VHS se inocularía en un tumor primario o secundario donde se produciría la replicación y la destrucción oncolítica del tumor. El problema de este enfoque es que el GM-CSF se utiliza para reclutar células presentadoras de antígeno en el sitio de la lesión, pero la captación de material tumoral por estas células es aleatoria. Las células presentadoras de antígeno son bastante efectivas para captar material particulado pequeño y antígenos solubles, pero son ineficientes para internalizar células o fragmentos
45 de células más grandes.

- 50 La inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral protectora requiere la captación de las células tumorales y de los componentes celulares por parte de las células presentadoras de antígeno, después el procesamiento de los antígenos tumorales y su transporte por células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos drenantes. En los ganglios linfáticos, los péptidos de antígenos tumorales inmunogénicos son presentados por células presentadoras de antígeno en asociación con moléculas MHC de clase I o clase II para la activación de células T CD8 + y CD4 +
55 específicas de tumor, respectivamente. Solo después de que estas células T son activadas por los péptidos antigénicos tumorales procesados y presentados, estos linfocitos proliferan, dejan los ganglios linfáticos y circulan en el cuerpo para buscar y destruir células tumorales metastásicas que expresan los antígenos tumorales relevantes. Por lo tanto, provocar una respuesta inmunitaria antitumoral efectiva requiere un direccionamiento efectivo y activo de células tumorales a células presentadoras de antígeno.

5 Por lo tanto, lo que se necesita son composiciones y métodos para reducir de forma no quirúrgica el tamaño del tumor a través de la lisis celular y la dirección activa de células tumorales, residuos celulares y fragmentos de membrana para el reclutamiento de células presentadoras de antígeno y la respuesta inmunitaria resultante. También se necesitan formas de aumentar la eficacia de la internalización de células tumorales y fragmentos de células mediante células presentadoras de antígeno dentro del microentorno tumoral.

Compendio de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un virus oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima hexosil transferasa, en donde la enzima es una enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa.

10 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el virus oncolítico como se define en la presente memoria en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un virus oncolítico como se define en la presente memoria o una composición farmacéutica como se define en la presente memoria para uso en el tratamiento del cáncer.

15 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para preparar el virus oncolítico como se define en la presente memoria que comprende la etapa de incorporar un ácido nucleico que codifica una enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa en el genoma de dicho virus oncolítico.

Breve descripción de los dibujos

20 Figura 1: Proporciona un esquema que muestra una serie de eventos celulares relevantes para los métodos actuales. Estos eventos incluyen A) administración de composiciones virales modificadas genéticamente, B) infección, replicación, expresión de alfa 1,3-galactosiltransferasa y epítomos alfa-gal, y C) oncolisis y reclutamiento de células presentadoras de antígeno en el sitio del tumor.

Figura 2: Proporciona un esquema que muestra una célula tumoral infectada con un virus oncolítico que contiene alfa 1,3-galactosil transferasa y que expresa epítomos alfa-gal en su superficie celular antes de la lisis. Los fragmentos de membrana marcados con alfa-gal son internalizados por células presentadoras de antígeno. (1) Las células tumorales contienen antígenos asociados a tumores (TAA, por sus siglas en inglés) en el citoplasma y en la membrana celular, que son exclusivos del tumor y de cada paciente individual. Estos TAA se presentan en la membrana celular como (●, ▲, ■) y como moléculas proteicas dentro de la célula (espirales y líneas onduladas). El virus oncolítico (círculos rellenos con 11 radios externos) introducido en la lesión tumoral contiene el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa insertado en su genoma. (2) El virus oncolítico que infecta las células tumorales introduce el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa en las células tumorales. Este gen se transcribe y traduce dentro de la célula infectada, lo que da como resultado la producción de la enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa (α 1,3GT). Esta enzima sintetiza epítomos alfa-gal en glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos de la superficie celular. La unión del anticuerpo anti-Gal natural a estos epítomos alfa-gal activa el sistema del complemento y, por lo tanto, genera factores quimiotácticos en forma de péptidos de escisión del complemento que reclutan células presentadoras de antígeno en la lesión tumoral tratada. (3) Las células tumorales se lisan por el virus oncolítico y por la unión de anti-Gal a los epítomos alfa-gal en las membranas celulares por citotoxicidad dependiente del complemento y por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). Las células muertas y las membranas celulares fragmentadas recubiertas con el anticuerpo anti-Gal (que está unido a los epítomos alfa-gal), son internalizadas por células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) a través de la interacción entre la parte Fc del anticuerpo anti-Gal que recubre las células, o membranas celulares, y los receptores Fc γ en la APC. Los TAA internalizados como resultado de esta captación son procesados por la APC, y los péptidos de TAA se presentan en la membrana celular de la APC en asociación con las moléculas MHC. Las APC migran a los ganglios linfáticos de drenaje donde los péptidos de TAA presentados se unen a los receptores de células T de células T específicas de tumores. Estas células T se activan como resultado de esta interacción. Las células T específicas de tumores activados proliferan y abandonan los ganglios linfáticos para circular, detectar y destruir células tumorales metastásicas.

Figura 3: proporciona una línea de tiempo esquemática para la aparición de alfa-1,3 galactosiltransferasa (α 1,3GT) y epítomos alfa-gal en células HeLa transducidas por el adenovirus que contienen el gen de la α 1,3GT (Ad α GT).

Figura 4: Proporciona un gráfico que muestra la expresión de epítomos alfa-gal en células de melanoma B16 de ratón transducidas con Ad α GT, según lo indicado por la unión de lectina (A) de *Bandeiraea simplicifolia* IB4 (BS) e IgG anti-Gal de ratón (B). A. Expresión de epítomos alfa-gal en células B16_{Ad α GT} (es decir, células B16 transducidas por Ad α GT [1x10¹⁰ unidades infecciosas (UI)/ml]), medida por citometría de flujo de células teñidas con lectina BS. La lectina está acoplada a la fluoresceína (FITC). Histograma de línea delgada con área punteada – células B16_{Adcont} (es decir, células de melanoma transducidas con adenovirus que no contienen genes insertados); histograma de línea gruesa- células B16_{Ad α GT}. B. Unión de anti-Gal en el suero de ratón knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa a epítomos alfa-gal en células BL6_{Ad α GT} (●), o en células B16_{Adcont} (○), según lo determinado por ELISA. Los datos son de 3 ratones representativos de 6 ratones con resultados similares.

Figura 5: Proporciona un gráfico que muestra la protección de los ratones knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa a partir de la provocación tumoral B16 utilizando la vacuna B16_{Ad α GT}. Los ratones knockout para

la alfa 1,3-galactosiltransferasa que producen anti-Gal fueron vacunados con 2×10^6 células B16 irradiadas que expresan epítomos alfa-gal (B16_{Ad α GT}) (●), o con células B16 irradiadas transducidas con adenovirus control (B16_{Adcont}) (○). Esta inmunización se repitió después de una semana. Los ratones se provocaron, una semana después, con 0.2×10^6 células B16 vivas (A), ó 0.5×10^6 células B16 vivas (B). Los ratones se monitorizaron todos los días durante 2 meses para el crecimiento del tumor. Los resultados se presentan como el porcentaje de ratones que permanecen libres de tumor a varios días después de la provocación tumoral. Los resultados son de 22 ratones en el grupo experimental y de 21 en el grupo control en (A) y en un experimento separado de 21 ratones en el grupo experimental y 18 en el grupo control (B).

Figura 6: Proporciona las estructuras genómicas de CRAd- α GT (A) y CRAd-GFP (B). La secuencia genómica de Ad5 se modificó para expresar el botón de fibra de Ad3. Las secuencias E3 o E1 se modificaron por delección o reemplazo con las secuencias de nucleótidos de los genes α 1,3GT o GFP, respectivamente.

Figura 7: Cuantificación de la viabilidad de las células cancerosas humanas después de la infección con CRAd- α GT. Las células A549 y A375 se sembraron en placas de 96 pocillos, se infectaron con una titulación en serie del virus a partir de 1.2×10^{11} partículas de virus (VP, por sus siglas en inglés)/ml de CRAd- α GT o 9.7×10^{10} VP/ml de virus control CRAd-GFP y se incubaron durante 72 horas. La viabilidad celular se cuantificó utilizando un ensayo de viabilidad celular luminiscente Cell Titre Glo (Promega).

Figura 8: Visualización de la viabilidad de las células cancerosas humanas después de la infección con CRAd- α GT. Se sembraron células A549 (carcinoma de pulmón) y A375 (melanoma) en placas de 24 pocillos, se infectaron con 3.6×10^7 partículas de virus (VP)/ml de CRAd- α GT o 1.9×10^{10} VP/ml de virus control CRAd-GFP y se incubaron durante 72 horas. La visualización se realizó mediante microscopía óptica con un aumento de 10x.

Figura 9: Análisis de la unión de anti-Gal a células cancerosas humanas después de la infección con CRAd- α GT. Las células A549 y A375 se infectaron con 1.44×10^6 partículas de virus (VP)/ml CRAd- α GT o 1.16×10^6 VP/ml de virus control CRAd-GFP. Las células se analizaron para determinar la unión de anti-Gal y la expresión de GFP mediante citometría de flujo.

Descripción detallada de la invención

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un virus oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima hexosil transferasa, en donde la enzima es una enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa.

La presente invención se refiere a composiciones para combinar la lisis inducida por virus oncolíticos de células tumorales con un direccionamiento inmunológico activo y el reclutamiento de células presentadoras de antígeno (APC) a un sitio tumoral. Los virus oncolíticos diseñados que expresan una hexosiltransferasa, tal como la alfa 1,3-galactosiltransferasa, modificarán la glicosilación de las células infectadas de modo que expresen epítomos alfa-gal en las membranas celulares antes de la lisis inducida por el virus. Cuando las células tumorales son posteriormente lisadas por el virus, los fragmentos de la membrana celular serán opsonizados por anticuerpos anti-Gal naturales que se unen a los epítomos alfa-gal para formar complejos inmunitarios. Los anticuerpos anti-Gal aumentarán la fagocitosis de los fragmentos de células tumorales por las APC a través de la interacción entre la región Fc de los anticuerpos anti-Gal y los receptores Fc γ (Fc γ R) en las APC. De manera similar, las células tumorales intactas que expresan epítomos alfa-gal después de la infección con el virus también se opsonizarán con anti-Gal y se recogerán con APC a través de Fc γ R. La captación de antígeno a través de Fc γ R provoca la activación y maduración de las APC, que procesan los antígenos tumorales para su presentación en las moléculas del MHC y migran a los ganglios linfáticos drenantes, donde presentan los antígenos tumorales a las células T. Mediante este método, se genera una respuesta inmunitaria protectora contra los antígenos tumorales del paciente.

Además de lo anterior, la expresión de epítomos alfa-gal en la superficie celular, y su posterior complejación con anticuerpos anti-Gal, conducirá a la activación del complemento. La activación del complemento da como resultado: liberación de péptidos quimiotácticos que reclutan APC al tumor; opsonización de células tumorales intactas y de fragmentos de membrana de células tumorales con moléculas de complemento C3b; lisis mediada por el complemento de células tumorales intactas. Las células tumorales intactas y los fragmentos de células tumorales opsonizados con moléculas de complemento C3b se unen e internalizan mediante APC a través de la interacción entre C3b y los receptores de complemento en la APC.

Por lo tanto, además de la lisis inducida por el virus oncolítico de células tumorales infectadas, la opsonización de las células tumorales y los fragmentos celulares con anticuerpos anti-Gal y la posterior activación del complemento y la formación de complejos inmunitarios, que son fagocitados por las APC, dan como resultado una respuesta inmunitaria antitumoral protectora. Por lo tanto, la alteración de una masa tumoral mediante la combinación de la oncolisis inducida por el virus y la activación inmunitaria se mejora con respecto a la administración separada de un virus no replicativo que expresa alfa 1,3-galactosiltransferasa, o de un solo virus oncolítico competente en la replicación que no expresa alfa 1,3-galactosiltransferasa.

La presente invención proporciona por lo tanto un tratamiento mejorado de varios tipos de cáncer, e incluso es posible el tratamiento de aquellos tipos que todavía no se han podido curar.

La presente invención está dirigida a composiciones que utilizan virus oncolíticos que se han modificado para administrar una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un gen de glicosil transferasa, alfa 1,3-galactosiltransferasa. La premisa es que el virus infecta específicamente las células tumorales, que después producen y expresan la enzima funcional alfa 1,3-galactosiltransferasa. La enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa produce e integra epítomos alfa-gal en la superficie de las células tumorales. La integración de los epítomos alfa-gal en la membrana de la célula tumoral se produce antes de la lisis celular inducida por el virus oncolítico, de manera que los restos de la membrana celular posterior se marcan con epítomos alfa-gal. Sin querer estar limitado por ningún mecanismo específico, se cree que la unión de fragmentos de células tumorales marcadas con alfa-gal por el anticuerpo natural anti-Gal activa el sistema del complemento (como lo hacen la mayoría de las interacciones antígeno/anticuerpo) y genera factores quimiotácticos de escisión del complemento que reclutan APC para el tumor tratado. Las células tumorales y los fragmentos de membrana de células tumorales que expresan epítomos alfa-gal están opsonizados por anti-Gal y se dirigen activamente a la fagocitosis por las APC reclutadas para el tumor. Se cree que el enfoque descrito en la presente memoria es mecánicamente diferente de los enfoques anteriores de virus oncolíticos que expresan GM-CSF, donde las APC internalizan aleatoriamente moléculas solubles que están en su proximidad por pinocitosis con fagocitosis mínima de material particulado. En el presente enfoque, las membranas de células tumorales son fagocitadas más eficientemente por las APC porque los fragmentos de células tumorales o células tumorales intactas expresan epítomos alfa-gal, que posteriormente se unen a anticuerpos anti-Gal. La interacción entre la porción Fc de los anticuerpos anti-Gal que recubren los fragmentos de células tumorales/células tumorales intactas y los FcγR en las APC estimulan a las APC para internalizar, procesar y presentar los antígenos a las células T. Además, la activación del complemento y la subsiguiente opsonización de los fragmentos de células tumorales y las células tumorales intactas con la proteína C3b del complemento permite que las APC que llevan receptores del complemento internalicen, procesen y presenten antígenos tumorales a las células T de manera efectiva.

Los métodos actuales son contrarios a la intuición porque presumiblemente no se buscaría modificar la glicosilación de la superficie de la célula tumoral con un virus oncolítico competente para la replicación para dirigir los fragmentos de la membrana celular y las células intactas para su captación por las APC.

La expresión y la integración de la membrana celular de los epítomos alfa-gal antes de la lisis celular inducida por el virus proporciona un método para marcar los fragmentos de membrana de la célula tumoral para el reclutamiento de APC y la captación activa por las APC, induciendo una respuesta inmunitaria antitumoral protectora en comparación con los métodos menos eficientes descritos anteriormente. Si bien no está limitado por ningún mecanismo específico, se proporcionan esquemas en las Figuras 1 y 2 que muestran un posible mecanismo mediante el cual se cree que las composiciones y métodos reivindicados tienen acción terapéutica.

Las realizaciones de la presente descripción emplearán, a menos que se indique lo contrario, técnicas de medicina, química orgánica, bioquímica, biología molecular, farmacología y similares, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura.

Debe observarse que, tal como se utiliza en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. En esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para que tengan los siguientes significados, a menos que sea evidente una intención contraria.

Antes de describir las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes definiciones y se deben utilizar a menos que se indique lo contrario.

I) Composiciones

Las composiciones útiles en la presente memoria comprenden un virus oncolítico y una secuencia de ácido nucleico que codifica una galactosil transferasa y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para la administración. Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el virus oncolítico como se define en la presente memoria en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

A) Virus

En una realización, el virus se modifica genéticamente para ser oncolítico. En una realización alternativa, el virus es oncolítico de forma natural.

En una realización, el virus oncolítico comprende un dominio de unión recombinante específico para un marcador de células madre tumorales.

En una realización, el virus está limitado en cuanto a su replicación y solo lisa las células cancerosas que salen de las células no cancerosas.

Los virus oncolíticos limitados en cuanto a su replicación son particularmente útiles para las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. Tales virus solo se replican y matan las células cancerosas. Además, pueden

codificar un gen (o genes) heterólogo que codifica una proteína, que tiene propiedades antitumorales adicionales. El término virus oncolítico se entiende que comprende cualquier virus que infecta/entra y lisa las células cancerosas. El virus oncolítico ideal mata de manera eficiente una fracción clínicamente relevante de las células cancerosas del paciente por citólisis directa con una destrucción mínima de tejido no neoplásico.

Se prefieren los virus oncolíticos (desde una perspectiva de seguridad) si de forma natural no son patógenos (p. ej., de forma natural no infectan a los humanos) o solo causan una enfermedad leve en los humanos (p. ej., los adenovirus causan síntomas similares a los de la gripe). Los virus que se han utilizado con éxito en vacunas aprobadas y se han administrado a miles o millones de personas (p. ej., la vacuna contra la viruela) también se prefieren por esta razón. Si un virus es patogénico en seres humanos y está vinculado a una enfermedad significativa (p. ej., neurotoxicidad asociada con algunas cepas del virus del herpes), se prefiere realizar múltiples deleciones o mutaciones en el genoma viral para hacerlo específico para las células cancerosas y reducir el riesgo de que un solo evento de recombinación genética con un virus endógeno conduzca a una cepa completamente patógena. La entrada de células tumorales dirigidas y la especificidad de replicación son deseables. Además, el virus debe ser seguro y apatogénico cuando se aplica en pacientes. Los virus oncolíticos obtenidos a partir de muchos tipos diferentes de virus han sido descritos por Liu *et al.* (Liu *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology 4: (2) 101-117, 2007). Entre estos virus envueltos, tal como, entre otros, el virus del herpes simple (VHS), el virus vaccinia (VV) y los paramixovirus como el virus del sarampión (VS), el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) o los rhabdovirus como el virus de la estomatitis vesicular (VSV), son los más destacados. Además de aplicar virus de tipo salvaje no modificados, la modificación genética puede mejorar aún más la seguridad y la eficacia de los virus oncolíticos.

Una característica clave de los vectores de virus oncolíticos limitados en cuanto a su replicación que codifican un gen heterólogo es que la dosis inicial del gen heterólogo se puede amplificar *in vivo* muchas veces por replicación en células cancerosas y liberación de células cancerosas dentro de la o las lesiones inyectadas. Esto lo enseñan, por ejemplo, Liu *et al.* (Liu *et al.*, 2003), quienes describen las características de un vector mutante del virus del herpes simple 1 (VHS-1) que codifica el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). En conjunto, estas terapias contra el cáncer se han denominado "vacunas terapéuticas armadas" (Bauzon y Hermiston, 2014). La modificación genética de las proteínas de la envuelta puede limitar la infección por virus a las células tumorales y la inserción de genes suicidas puede mejorar los efectos terapéuticos (Nakamura y *et al.*, Expert Opin. Bio. Ther. 4: (10): 1685-1692, 2004); Liu *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology 4: (2) 101-117, 2007; Liu *et al.*, Gene Therapy, 10(4), 292-303, 2003).

Los virus se pueden obtener a partir de cepas adaptadas en laboratorio bien caracterizadas que se han mantenido mediante múltiples pasajes en serie a través de líneas celulares inmortalizadas en cultivos de tejidos. Sin embargo, los tumores humanos en pacientes crecen más lentamente que las líneas celulares inmortalizadas en condiciones de cultivo optimizadas, y pueden tener otros factores ambientales y de desarrollo que limitan la tasa de metabolismo y la división celular (tal como el entorno hipóxico que puede existir en el centro de una masa tumoral grande, resultado de un suministro insuficiente de nutrientes). Por lo tanto, es preferible seleccionar un virus para el crecimiento óptimo *in vivo* (*in situ*) en lugar de basarse en sus características de crecimiento en el cultivo de tejidos. Por ejemplo, se ha utilizado una cepa de VHS-1 obtenida a partir del aislado clínico JS1 (obtenido de un paciente y que solo ha sufrido un corto tiempo de propagación en cultivo de tejidos) para generar virus oncolíticos para el tratamiento de pacientes con cáncer (Liu, 2003). Una consideración importante al seleccionar un aislado clínico es que las condiciones óptimas se pueden identificar de manera que se puedan propagar *in vitro*, lo cual es necesario para la ampliación y la fabricación del material clínico. Se contemplan mutaciones en el genoma que mejoran la replicación del virus en cultivo de tejidos sin perjudicar su crecimiento en tumores *in vivo*.

Además de seleccionar un vector de virus en función de su capacidad para replicarse y lisar tejido tumoral en pacientes, se contemplan mutaciones adicionales en el genoma que mejoran aún más su capacidad para replicarse *in vivo*. Por ejemplo, dos genes se eliminan de la cepa clínica de VHS-1, JS1 (Liu, 2003). La primera deleción, ICP34.5, limita la replicación del virus a las células cancerosas; la segunda, ICP47, da como resultado la expresión temprana de US11, que codifica una proteína viral que bloquea la fosforilación de la proteína anfitriona, PKR. La PKR es un componente clave de la respuesta inmunitaria innata a la infección viral: tras la fosforilación, detiene la traducción de proteínas en las células infectadas y limita la replicación viral. Por lo tanto, la replicación *in vivo* de la cepa JS1 ICP34.5-/ICP47- mutante se potencia en relación con la cepa de tipo salvaje (no mutada).

En diversas realizaciones, el virus oncolítico es un adenovirus competente para la replicación oncolítica, virus de vaccinia, virus del herpes, reovirus, virus del sarampión o virus de la enfermedad de Newcastle.

En otra realización, el virus es un virus basado en ARN o ADN de origen humano o no humano, como adenovirus, herpesvirus, virus vaccinia, virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, parvovirus autónomos, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o reovirus.

Los virus oncolíticos ejemplares mostrados en la Tabla 1 están actualmente en ensayos clínicos y se pueden modificar como se describe en la presente memoria para uso en los métodos terapéuticos proporcionados. En diferentes realizaciones, el virus oncolítico es un virus envuelto obtenido a partir de las familias de virus herpesviridae, poxviridae, rhabdoviridae o paramyxoviridae, preferiblemente de la familia Paramyxoviridae, género Morbillivirus.

Tabla 1: Virus oncolíticos evaluados clínicamente

Virus	Nombre	Tipo de cáncer
Adenovirus	ONYX-015 H101	SCCHN Glioma Ovario
	CGTG-102	Tumores sólidos
	CG0070	Vejiga
	ICOVIR-5	Tumores sólidos
	ColoAd1	Colorrectal
Virus vaccinia	GLONC1	Tumores sólidos
	JX-594	Tumores de hígado Tumores sólidos IV
Herpesvirus	G207	Glioma
	NV1020	Tumores de hígado IA
	TVec	Mama SCCHN Melanoma IT Tumores de hígado
Reovirus	Reolisina	SCCHN IT Tumores sólidos IV
Virus del sarampión	MV-CEA	Ovario IP
	MV-NIS	Ovario IP Glioma IT Mieloma IV Mesotelioma
NDV	PV701	Tumores sólidos

De Bauzon & Hemiston, 2014

5 Algunos virus oncolíticos están modificados genéticamente para conferir replicación específica de tumores (adenovirus, herpesvirus, virus de la vacuna), mientras que otros son virus específicos de tumores de forma natural (reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, parvovirus autónomos, ciertas cepas de sarampión y virus de la estomatitis vesicular (VSV)).

i) Adenovirus

10 En una realización, el virus oncolítico es un adenovirus. Los datos se presentan en la presente memoria en los Ejemplos 1-3 y 8 y en las Figuras 4-9 que demuestran los resultados positivos logrados utilizando adenovirus que contienen alfa 1,3-galactosiltransferasa. Los adenovirus humanos son virus de ADN de doble cadena no envueltos, de aproximadamente 30-38 kB. Una característica clave de los adenovirus es que codifican una serie de proteínas virales que inhiben proteínas reguladoras anfitrionas críticas. Algunas de estas proteínas reguladoras anfitrionas (como la p53) son defectuosas en muchos cánceres. Por lo tanto, la eliminación del gen viral hace que los virus mutantes sean selectivos para la replicación en cánceres con la proteína anfitriona reguladora defectuosa.

15 Por lo tanto, la mutación del gen E1B-55kD del adenovirus, una proteína inhibidora de p53 (por ejemplo, en el virus dl1520), es selectiva para tumores que tienen una función limitada o nula de p53. La función de p53 se pierde en la mayoría de los cánceres humanos a través de varios mecanismos que incluyen la mutación genética, la sobreexpresión de los inhibidores de la unión de p53 (p. ej., mdm2, virus del papiloma humano ARF E6) y la pérdida de la vía inhibitoria de p53 modulada por p14^{ARF}.

20 De manera similar, las deleciones en la región 2 conservada E1a tienen una unión defectuosa a la proteína del retinoblastoma (RB), y estos mutantes se están evaluando para su uso contra tumores con anomalías en la vía de RB (por ejemplo, en el virus d/922/947).

25 Otro enfoque para obtener la replicación selectiva de células cancerosas de los adenovirus es controlar la expresión del producto del gen E1a viral utilizando un promotor que es específico para el tejido o el cáncer de interés. Por ejemplo, esto se ha aplicado a adenovirus oncolíticos que atacan el cáncer de próstata (por modificación genética del

genoma para introducir el promotor/potenciador del antígeno prostático específico (PSA) secuencia arriba del gen E1a).

5 En una realización, el virus es un adenovirus de replicación condicional (CRAd, por sus siglas en inglés), en el que la replicación está limitada a células tumorales. Se ha demostrado que los CRAd se replican selectivamente en las células cancerosas, causando su lisis y muerte (Fueyo *et al.*, 2000; Kanno *et al.*, 2012; Bramante *et al.*, 2015). Los CRAd se han generado utilizando el adenovirus 5 (Ad5) que se modificó genéticamente para expresar el botón de fibra del adenovirus 3 (Ad3), para crear un virus quimérico Ad5/3 (Kanerva *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2013).

10 Por lo tanto, en una realización, el CRAd es un virus quimérico Ad5/3. El virus quimérico Ad5/3 es capaz de unirse a las células y ganar la entrada utilizando CD46, el receptor Ad3, en lugar del receptor coxsackie-adenovirus (CAR, por sus siglas en inglés), que se une mediante Ad5. Esto es ventajoso ya que muchos tumores tienen una expresión variable de CAR, mientras que todas las células nucleadas expresan CD46 (Ulasov *et al.*, 2006). El virus se vuelve condicionalmente replicativo al introducir una delección de 24 bases ($\Delta 24$) en la región constante 2 (CR2) del gen viral inmediato temprano (E1a) (Kanerva *et al.*, 2003). Por lo tanto, en una realización, el virus quimérico Ad5/3 comprende además una delección de 24 bases ($\Delta 24$) en la región constante 2 (CR2) del gen viral inmediato temprano (E1a), conocido en la presente memoria como Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd. Esta mutación da como resultado una proteína viral E1a que es incapaz de unirse a la proteína retinoblastoma (Rb) para la inducción de la fase S dentro de la célula (Fueyo *et al.*, 2000). Por lo tanto, el virus no se puede replicar en células normales que no se dividen, pero se replica de manera eficiente en células que tienen una vía Rb/p16 inactiva, un fenotipo indicado para ser compartido por todos los cánceres (Sherr, 1996). El AdAd/3- $\Delta 24$ CRAd quimérico, que se replica condicionalmente, se puede modificar aún más mediante la sustitución del gen de la región temprana de adenovirus (E3) con un transgén, que da como resultado un AdAd/3- $\Delta 24$ CRAd que produce específicamente el transgén durante la replicación (Koski *et al.*, 2010; Kanerva *et al.*, 2013; Bramante *et al.*, 2015). El Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd quimérico, que se replica condicionalmente, se ha modificado aún más mediante la sustitución del gen de la región temprana (E3) del adenovirus con un transgén alfa 1,3-galactosiltransferasa, que resulta en un AdAd Ad/3- $\Delta 24$ que produce específicamente alfa 1,3-galactosiltransferasa durante la replicación. Por lo tanto, en una realización, el AdAd/3- $\Delta 24$ CRAd comprende además un transgén alfa 1,3-galactosiltransferasa, conocido en la presente memoria como CRAd-aGT. Los datos se presentan en la presente memoria en el Ejemplo 8 y las Figuras 6-9 que demuestran que las células de carcinoma humano de pulmón y melanoma infectadas con CRAd-aGT expresan epítomos alfa-gal en la superficie celular y están unidas por anticuerpos anti-Gal antes de la lisis inducida por el virus.

ii) Virus del herpes

En una realización, el virus oncolítico es un virus del herpes. La metodología se presenta en la presente memoria en los Ejemplos 4-7, que demuestra cómo se pueden lograr resultados positivos utilizando el virus del herpes que contiene alfa-1,3 galactosiltransferasa. El virus del herpes (VHS) es un virus de ADN de doble cadena envuelto de aproximadamente 152 kbp, y tiene un tropismo natural para las células neuronales y de la mucosa. Se ha sugerido que el VHS es de utilidad como vector de inserción de genes en el sistema nervioso y en otros lugares y para el tratamiento oncolítico del cáncer. Sin embargo, en ambas aplicaciones, el virus debe estar desactivado de manera que ya no sea patógeno, sino que pueda entrar en las células y realizar la función deseada. Por lo tanto, para la inserción de genes no tóxicos a las células diana que utilizan VHS, se ha hecho evidente que en la mayoría de los casos, la expresión de genes tempranos inmediatos se debe evitar/minimizar a partir del virus. Para el tratamiento oncolítico del cáncer, que también puede incluir la inserción de uno o más genes que mejoran el efecto terapéutico, se han identificado varias mutaciones al VHS que aún permiten que el virus se replique en cultivo o en células que se dividen activamente *in vivo* (p. ej., en tumores), pero que impiden una replicación significativa en el tejido normal. Tales mutaciones incluyen la alteración de los genes que codifican ICP34.5, ICP6 y timidina quinasa. De estos, virus con mutaciones a ICP34.5, o ICP34.5 junto con mutaciones de, p. ej. ICP6 ha mostrado hasta ahora el perfil de seguridad más favorable. Se ha demostrado que los virus eliminados solo para ICP34.5 se replican en muchos tipos de células tumorales *in vitro* y se replican de manera selectiva en tumores cerebrales inducidos artificialmente en ratones, mientras que evitan el tejido circundante. Las primeras fases de los ensayos clínicos también han demostrado su seguridad en el hombre. Ejemplos de tales virus y usos se describen en las publicaciones PCT n° WO 2001/053506, WO 98/004726, WO 98/051809 y WO 99/060145.

En una realización, el virus oncolítico es un virus VHS1. Una cepa de virus oncolítica ejemplar es la cepa JS 1 del VHS1 depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, por sus siglas en inglés), CAMR, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido, el 2 de enero de 2001 con el número de registro 01010209. Las cepas de virus oncolíticos como esta se pueden modificar como se describe en la presente memoria para expresar enzimas galactosil transferasa para uso en los métodos proporcionados.

iii) Virus vaccinia

En una realización, el virus oncolítico es un virus vaccinia. El virus vaccinia es un virus de ADN de doble cadena envuelto de aproximadamente 200 kB. Este virus se replica en el citoplasma, trayendo con sus partículas infecciosas las enzimas necesarias para la replicación del ADN y la transcripción de sus genes. El virus vaccinia tiene muchos atributos que lo hacen un buen virus oncolítico. Tiene un gran genoma con capacidad para albergar múltiples genes extraños, tiene un amplio rango de anfitriones, se replica rápidamente y se puede recombinar fácilmente para producir

mutantes virales. Se ha establecido un buen historial de seguridad mediante el uso del virus vaccinia como una vacuna contra la viruela.

iv) Virus del sarampión

5 En una realización, el virus es un virus del sarampión (MeV) o una cepa de vacuna de MeV tal como la cepa de Edmonston (MeV_{Edm}, por sus siglas en inglés). MeV utiliza dos glicoproteínas de la envoltura (la proteína de fusión (F) y la proteína hemaglutinina (H)) para entrar en la célula diana. La proteína F es una proteína transmembrana de tipo I, mientras que la proteína H es un dominio transmembrana de tipo II, es decir, su extremo amino está expuesto directamente a la región citoplásmica. Ambas proteínas comprenden por lo tanto una región transmembrana y una
10 región citoplásmica. Una función conocida de la proteína F es mediar la fusión de las membranas virales con las membranas celulares de la célula anfitriona. Las funciones atribuidas a la proteína H incluyen reconocer el receptor en la membrana diana y apoyar la proteína F en su función de fusión de membrana. La fusión de membrana directa y altamente eficiente en la membrana de la superficie celular es una propiedad particular del virus del sarampión y los morbillivirus, por lo tanto se distingue de muchos otros virus envueltos que se endocitan y solo se fusionarán con la
15 caída del pH después de la endocitosis. Ambas proteínas se organizan en la superficie viral en una matriz regular de picos apretados, tetrámeros H y trímeros F (Russell *et al.*, Virology 199: 160-168, 1994).

La cepa Edmonston de MeV (MeV_{Edm}) utiliza una proteína única como su receptor principal, concretamente, la proteína que se sabe que regula el factor de activación del complemento, CD46 (Gerlier *et al.*, Trends Microbiol. 3: 338-345, 1995). CD46 se expresa en todas las células humanas nucleadas. Sin embargo, la mayoría de los aislados clínicos
20 del virus del sarampión no pueden utilizar CD46 como receptor. La SLAM humana (molécula de activación de linfocitos de señalización; también conocida como CDw150) es una glicoproteína de membrana recientemente descubierta que se expresa en algunas células T y B, y también se encontró que actúa como un receptor celular para MeV, incluida la cepa Edmonston (Tatsuo *et al.*, Nature 406 (6798): 893-7, 2000). Las funciones biológicas precisas y las interacciones de las proteínas H y F de MeV siguen siendo poco claras.

25 Hay varios virus oncolíticos en el desarrollo clínico para el cáncer que se pueden modificar para incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica la hexosil transferasa, tal como alfa1,3-galactosiltransferasa. Ejemplos de tales virus oncolíticos incluyen Ad-mda7 (p53 Inc), Ad-p53 (p53 Inc.), CG-0070 (Cold Genesys, Inc.), DNX-2401 (DNAtrix, Inc.), DWP-418 (Daewoong Pharmaceutical), VHS que expresa huIL-12 (Univ. Alabama Birmingham), G-47 Delta (Univ. Hospital de Tokio), ganciclovir/ADV-TK (Shenzhen Tiandakang), GLONC-1 (Genelux Corp.), GLONC-2 (Genelux Corp.), GLONC-3 (Genelux Corp.), HF-10 (Takara Holdings), VHS-1716 (Virtu Biologies), JX-929 (Jennerex Bioterapeutics), KH-901 (Chengdu Kanghong Pharmaceuticals), MV-NIS Vaccine (Mayo Clinic), NDV-HUJ oncolítico (Hadassah medical), OBP-301 (Oncolys BioPharma), AdV oncolítico (Erasmus MC), ONCOS-102 (Oncos Therapeutics), ORCA-010 (Orca Therapeutics), Parvovirus H-1 (Oryx GmbH), pexastimogene devacirepvec (Jennerex Bioterapeutics), PV-701 (Wellstat Biologies), talimogene laherparepvec (Amgen), TG-1042 (Ascend Biopharmaceuticals), VCN-01 (VCN Biosciences) y VirRx-007 (p53 Inc.).
35

Los virus de la invención infectan y se replican en células tumorales, matando posteriormente las células tumorales. Por lo tanto, tales virus son competentes para la replicación. Preferiblemente, son competentes para la replicación selectiva en células tumorales. Esto significa que o bien se replican en células tumorales y no en células no tumorales, o que se replican más eficazmente en células tumorales que en células no tumorales. Las células en las que el virus es capaz de replicarse son células permisivas.
40

La medición de la capacidad de replicación selectiva se puede llevar a cabo mediante los ensayos descritos en la presente memoria para medir la replicación y la capacidad de destrucción de células tumorales, y también se puede analizar mediante las técnicas estadísticas mencionadas en la presente memoria si se desea.

45 Un virus de la invención tiene preferiblemente una capacidad mayor que una cepa parental no modificada para infectar o replicarse en una célula tumoral, para destruir células tumorales o para diseminarse entre células en tejidos. Preferiblemente esta capacidad es una capacidad mayor estadísticamente significativa. Por ejemplo, un virus según la invención puede tener hasta 1.1 veces, 1.2 veces, 1.5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces la capacidad de la cepa parental no modificada con respecto a la propiedad que se está sometiendo a ensayo.

50 Las propiedades de la cepa del virus con respecto a las células tumorales se pueden medir de cualquier manera conocida en la técnica. Por ejemplo, la capacidad de un virus para infectar una célula tumoral se puede cuantificar midiendo la dosis de virus requerida para infectar un porcentaje dado de células, por ejemplo el 50% o el 80% de las células. La capacidad para replicarse en una célula tumoral se puede medir mediante mediciones de crecimiento como las que se llevan a cabo en los Ejemplos, p. ej. midiendo el crecimiento del virus en las células durante un período de 6, 12, 24, 36, 48 o 72 horas o más. De manera similar, la capacidad de un virus para lisar células tumorales se puede
55 cuantificar midiendo la proporción de células vivas (versus muertas) en cultivos incubados con una dosis dada de virus durante un período de 6, 12, 24, 36, 48 o 72 horas o más.

B) Secuencias de ácido nucleico heterólogo y promotores

Los virus de la invención se pueden modificar para portar secuencias de ácido nucleico heterólogas. En un aspecto de la invención, la secuencia de ácido nucleico codifica alfa 1,3-galactosiltransferasa. Los términos "α1,3-

- galactosiltransferasa", "alfa-1,3-galactosiltransferasa", "alfa1,3GT", "α1,3GT", "glicoproteína alfa galactosiltransferasa 1" y "GGTA1", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier enzima capaz de sintetizar epítomos alfa-gal. La enzima se produce en la mayoría de los mamíferos, con la excepción de los humanos, los simios y los monos del Viejo Mundo. La estructura de carbohidratos producida por la enzima es inmunogénica en humanos y la mayoría de las personas sanas tienen altos títulos de anticuerpos anti-alfa naturales, también conocidos como anticuerpos "anti-Gal". En algunas realizaciones, el término "alfa 1,3GT" se refiere a un ratón alfa1,3GT (p. ej., *Mus musculus* - nucleótidos 460 a 1680 de GENBANK n° de registro NM_010283) y su producto génico, así como a sus homólogos mamíferos funcionales (p. ej., otros monos del Nuevo Mundo, prosimios y mamíferos no primates, pero no monos del Viejo Mundo, simios y humanos). En algunas realizaciones, el término "alfa1,3GT" se refiere al gen del tití común (p. ej., *Callithrix jacchus* - N° de registro de GENBANK S71333), alfa1,3GT bovino (p. ej., *Bos taurus* - N° de registro de GENBANK NM_177511), alfa1,3GT felino (p. ej., *Felis catus* - N° de registro de GENBANK NM_001009308), alfa1,3GT ovino (p. ej., *Ovis aries* - N° de registro de GENBANK NM_001009764), alfa1,3GT de rata (p. ej., *Rattus norvegicus* - N° de registro de GENBANK NM_145674) y alfa1,3GT porcino (p. ej., *Sus scrofa* - N° de registro de GENBANK NM_213810). Algunas realizaciones de la presente invención comprenden una variante funcional de una alfa1,3GT de mamíferos, que difiere de las secuencias alfa1,3GT de mamíferos de tipo salvaje en, por ejemplo, menos del 1-5% de los restos. En particular, se contemplan para encontrar uso en las composiciones de la presente invención a las variantes alfa1,3GT que incluyen, pero no se limitan a, variantes funcionales alfa1,3GT naturales de mamíferos, así como a las variantes no naturales generadas por medios recombinantes u otros (p. ej., 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, que corresponden preferiblemente a un resto de un homólogo funcional de alfa1,3GT de mamífero). En otras realizaciones, se emplean formas truncadas de un alfa1,3GT de mamífero, que retienen la actividad catalítica (p. ej., GGTA1 que carece de la región del tallo N-terminal de 90 aminoácidos). Sin embargo, la eliminación de 3 aminoácidos del extremo C de esta enzima da como resultado su inactivación completa (Henion, T.R., B.A. Macher, F. Anaraki y U. Galili, *Glycobiology* 4: 193-201, 1994).
- La alfa1,3-galactosiltransferasa se modificó genéticamente previamente en adenovirus y se utilizó para la transferencia celular (Deriy *et al.* *Glycobiology*, 12 (2), 135-44 2002; Deriy *et al.* *Cancer Gene Therapy*, 12 (6), 528-39, 2005). La alfa 1,3-galactosiltransferasa nunca ha sido modificada genéticamente para ser expresada por virus oncolíticos para el método de combinación lisis/inmunización descrito en la presente memoria.
- En las realizaciones descritas en la presente memoria, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está preferiblemente unida operablemente a una secuencia de control que permite la expresión de dicho gen en una célula *in vivo*. Los virus de la invención se pueden utilizar, por lo tanto, para administrar las secuencias de ácido nucleico heterólogas a una célula *in vivo* donde se expresarán.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para preparar el virus oncolítico como se define en la presente memoria que comprende la etapa de incorporar un ácido nucleico que codifica una enzima alfa-1,3-galactosiltransferasa en el genoma de dicho virus oncolítico.
- La secuencia de ácido nucleico heteróloga se puede insertar en el genoma viral mediante cualquier técnica adecuada, tal como la recombinación homóloga de cepas del VHS con, por ejemplo, vectores plasmídicos que portan el gen flanqueado por secuencias del VHS.
- La secuencia de ácido nucleico heteróloga se puede introducir en un vector de plásmido adecuado que comprende secuencias virales de herpes utilizando técnicas de clonación bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, en una realización, dicha etapa de incorporación comprende la clonación. La secuencia de ácido nucleico heteróloga se puede insertar en el genoma viral en cualquier localización, siempre que las propiedades oncolíticas todavía se conserven. La secuencia de ácido nucleico heteróloga se puede insertar en múltiples sitios dentro del genoma del virus. Por ejemplo, se pueden insertar de 2 a 5 genes en el genoma.
- La secuencia transcrita de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga está preferiblemente unida operablemente a una secuencia de control que permite la expresión del gen en una célula tumoral. El término "unido operablemente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "unida operablemente" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra en condiciones compatibles con la secuencia de control.
- La secuencia de control comprende un promotor que permite la expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga y una señal para la terminación de la transcripción. El promotor se selecciona de promotores que son funcionales en mamíferos, preferiblemente en células tumorales humanas. El promotor se puede obtener a partir de secuencias promotoras de genes eucariotas. Por ejemplo, el promotor se puede obtener a partir del genoma de una célula en la que se produce la expresión del gen heterólogo, preferiblemente un mamífero, preferiblemente una célula tumoral humana. Con respecto a los promotores eucariotas, pueden ser promotores que funcionan de manera ubicua (tales como promotores de beta-actina, tubulina) o, alternativamente, de una forma específica de tumor. También puede haber promotores que respondan a estímulos específicos, por ejemplo, promotores que se unen a los receptores de hormonas esteroideas. También se pueden utilizar promotores virales, por ejemplo, el promotor de repetición terminal larga (MMLV LTR, por sus siglas en inglés) del virus de la leucemia murina de Moloney u otros promotores retrovirales, el promotor IE del citomegalovirus (CMV) humano o de ratón, o promotores de los genes del virus del herpes, incluidos

aquellos que conducen a la expresión de las transcripciones asociadas a la latencia.

5 Los casetes de expresión y otras construcciones adecuadas que comprenden la secuencia heteróloga de ácido nucleico y las secuencias de control se pueden hacer utilizando técnicas de clonación habituales conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning – A laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

10 También puede ser ventajoso que los promotores sean inducibles de modo que los niveles de expresión de la secuencia de ácido nucleico heterólogo se puedan regular durante el tiempo de vida de la célula tumoral. Inducible significa que los niveles de expresión obtenidos utilizando el promotor pueden ser regulados. Por ejemplo, un virus de la invención puede comprender además una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica la proteína de fusión del activador de la transcripción VP 16/represor tet bajo el control de un promotor fuerte (p. ej., el promotor IE de CMV IE) y la secuencia de ácido nucleico heteróloga puede estar bajo el control de un promotor sensible a la proteína de fusión del activador de la transcripción VP 16 represor tet dado a conocer previamente (Gossen y Bujard, 1992, Gossen *et al.*, 1995). Por lo tanto, en este ejemplo, la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico dependería de la presencia o ausencia de tetraciclina.

15 Se pueden acomodar múltiples genes heterólogos en el genoma del virus del herpes. Por lo tanto, un virus de la invención puede comprender dos o más secuencias de ácido nucleico heterólogas, por ejemplo de 2 a 3, 4 o 5 secuencias de ácido nucleico heterólogas. Más de un gen y las secuencias de control asociadas se podrían introducir en una determinada cepa del virus oncolítico, ya sea en un solo sitio o en múltiples sitios en el genoma del virus. Alternativamente, se pueden utilizar pares de promotores (los mismos o diferentes promotores) que se enfrentan en orientaciones opuestas entre sí, conduciendo cada uno a la expresión de una secuencia de ácido nucleico heterólogo.

20 En otra realización, una proteína inmunomoduladora se coexpresa con la enzima alfa 1,3-galactosil transferasa. Preferiblemente, la proteína inmunomoduladora potenciará la actividad antitumoral del virus. Más preferiblemente, la proteína es GM-CSF u otra citoquina, una quimiocina tal como RANTES u otra molécula inmunomoduladora tal como B7.1, B7.2 o CD40L. Más preferiblemente, la molécula inmunomoduladora es GM-CSF. Por lo tanto, en una realización, el virus oncolítico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica GM-CSF. El gen inmunomodulador puede ser cualquier variante alélica de un gen de tipo salvaje, o puede ser un gen mutante. El gen inmunomodulador se obtendrá a partir de un mamífero, preferiblemente un roedor o primate, más preferiblemente un humano.

30 C) Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de los virus oncolíticos de la presente invención se pueden formular de cualquier manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular para una variedad de modos de administración, que incluyen administración sistémica, tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa.

35 En una realización, la composición del virus oncolítico se formula para administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración intratumoral, administración subcutánea, administración oral, administración rectal, administración intravaginal, administración intranasal, administración transmucosa o administración transdérmica.

40 En una realización adicional, la composición del virus oncolítico se formula para administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración subcutánea, administración oral, administración rectal, administración intravaginal, administración intranasal, administración transmucosa o administración transdérmica.

45 La liberación de virus oncolíticos adecuados a las células cancerosas que se van a tratar se puede realizar utilizando un virus desnudo o mediante la encapsulación del virus en un vehículo, p. ej. en nanopartículas, liposomas u otras vesículas.

50 La administración es preferiblemente en una "cantidad terapéuticamente efectiva", siendo esto suficiente para mostrar beneficios para el individuo. La cantidad real administrada, y la velocidad y el tiempo de administración dependerán de la naturaleza y la gravedad del tumor que se esté tratando. La prescripción de tratamiento, p. ej. las decisiones sobre la dosis, etc, están a cargo de los médicos generales y otros médicos, y generalmente tienen en cuenta el trastorno a tratar, la condición del paciente individual, el sitio de liberación, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos. Ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

55 El virus oncolítico se puede administrar en cualquier cantidad de dosis terapéuticamente efectiva. Las dosis terapéuticamente efectivas pueden ser aproximadamente, pero no se limitan a, 10^3 , aproximadamente 10^4 , aproximadamente 10^5 , aproximadamente 10^6 , aproximadamente 10^7 , aproximadamente 10^8 o aproximadamente 10^9 unidades formadoras de placa (ufp).

5 Para la administración sistémica, se prefiere la inyección, que incluye intratumoral, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para los fines de la inyección, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular en soluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en forma sólida y volver a disolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. Las formas liofilizadas de la composición farmacéutica también son adecuadas.

10 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, se pueden utilizar detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosa puede ocurrir utilizando aerosoles nasales o supositorios. Para la administración tópica, las partículas de vector de la invención se pueden formular en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Una solución de lavado también se puede utilizar localmente para tratar una lesión o inflamación con el fin de acelerar la curación.

15 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, p.ej. mediante inyección de bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma farmacéutica unitaria, p. ej. en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido opcionalmente. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular además como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener otros agentes que incluyen agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

20 La invención también incluye un kit que comprende una composición farmacéutica de la invención y un dispositivo de administración para administrar la composición a un sujeto. A modo de ejemplo, el dispositivo de administración puede ser una botella de pulverización comprimible, una botella de pulverización de dosis medidas, un dispositivo de pulverización de aerosol, un atomizador, un dispositivo de administración de polvo seco, un dispositivo de dispensación de polvo/disolvente autopulsado, una jeringa, una aguja, un tampón o un recipiente para medir la dosis. El kit puede comprender además un material de instrucción como se describe en la presente memoria.

II) Métodos

30 Las composiciones de virus de la invención se pueden utilizar en métodos de terapia contra el cáncer del cuerpo humano o animal. En particular, los virus de la invención se pueden utilizar en el tratamiento oncolítico del cáncer, con o sin terapia profármaco adicional o estimulación de una respuesta inmunitaria antitumoral. Las composiciones de virus de la invención se pueden utilizar en el tratamiento terapéutico de cualquier tumor sólido en un mamífero, preferiblemente en un humano.

Por lo tanto, se describe un método para tratar a un individuo con una neoplasia que comprende las etapas de:

- 35
- i) expresar una enzima endógena liberada por el virus oncolítico como se define en la presente memoria en al menos una célula cancerosa para modificar la glicosilación de la membrana celular; e
 - ii) inducir la lisis de al menos una célula cancerosa resultante de la administración del virus oncolítico.

40 En un ejemplo, el método está dirigido a tratar a un individuo con cáncer mediante la administración de una cantidad efectiva de una composición de virus oncolítico en donde la infección por virus causa la expresión de hexosil transferasa antes de la lisis.

En un ejemplo, el virus oncolítico se administra en una cantidad efectiva para infectar al menos una célula cancerosa en el individuo.

En una realización, los epítopos alfa-gal se insertan en la membrana celular infectada dentro de las 10 horas de la infección.

45 En otra realización, los epítopos alfa-gal se insertan en la membrana celular infectada antes de la lisis de la célula infectada.

En un ejemplo, el método está dirigido a tratar a un individuo con cáncer.

En otro ejemplo, el método está dirigido a tratar a un individuo con un tumor.

En otro ejemplo, el método está dirigido a tratar a un individuo con cáncer.

50 En una realización, la membrana celular modificada se dirige activamente a los fragmentos de membrana para el reclutamiento de células presentadoras de antígeno.

En otra realización, la enzima es suficiente para expresar epítopos alfa-gal en la membrana celular infectada antes de la lisis.

En otra realización, la expresión de alfa1,3-galactosiltransferasa es suficiente para inducir una respuesta inmunitaria efectiva a la célula infectada después de la lisis.

5 En otra realización, los epítomos alfa-gal son suficientes para atraer células presentadoras de antígeno al sitio del tumor.

En otra realización, la enzima se expresa dentro de las 4 horas posteriores a la infección.

En otra realización, los epítomos alfa-gal son suficientes para unirse a anticuerpos anti-gal en el sitio del tumor.

10 La destrucción de tumores mediada por anti-Gal descrita en este método se puede lograr mediante la inyección de vectores de terapia génica que contienen el gen de la alfa1,3-galactosiltransferasa. En un ejemplo, la presente descripción contempla un método para tratar pacientes con melanoma con metástasis múltiples que comprenden inyecciones intratumorales de virus oncolíticos competentes para la replicación que contienen el gen de la alfa1,3-galactosiltransferasa. En una realización, la inyección intratumoral de composiciones virales da como resultado células tumorales transducidas que expresan epítomos alfa-gal, en donde estas células tumorales inducen inflamación intratumoral antes de la lisis. La inflamación intratumoral recluta células presentadoras de antígeno, tal como las células dendríticas, macrófagos y ciertas células B. Las células infectadas pueden ser lisadas por las composiciones de virus competentes para la replicación modificadas genéticamente descritas en la presente memoria o, de forma alternativa, se pueden destruir mediante el anticuerpo anti-Gal natural unido a los epítomos alfa-gal en las células transducidas a través de la citólisis dependiente del complemento (CDC) o mediante mecanismos de citólisis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Aunque no es necesario comprender el mecanismo de una invención, se cree que las membranas tumorales opsonizadas con anti-Gal dirigirán activamente los fragmentos de la membrana de la célula tumoral o las células tumorales intactas a las células presentadoras de antígeno y, por lo tanto, promoverán la inmunidad protectora antitumoral.

25 En otro ejemplo, la presente descripción contempla un método para tratar pacientes con carcinoma colorrectal que tienen múltiples metástasis en el colon y en el hígado que comprende inyecciones intratumorales de virus oncolíticos que contienen el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa. En una realización, la inyección comprende colonoscopia o laparoscopia como medio de administrar el vector viral en las lesiones tumorales.

En otro ejemplo más, la presente descripción contempla un método para tratar pacientes con carcinoma de pulmón que tienen múltiples metástasis en los pulmones que comprenden inyecciones intratumorales de virus oncolíticos que contienen el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa. En una realización, la inyección comprende broncoscopia.

30 En otro ejemplo, la presente descripción contempla un método para tratar pacientes con carcinoma de vejiga urinaria que comprende un virus oncolítico que contiene el vector viral del gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa. En una realización, el vector se administra por medio de cistoscopia.

35 En otro ejemplo, la presente descripción contempla un método para tratar pacientes con adenocarcinoma pancreático que comprende un virus oncolítico que contiene el vector viral del gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa. En una realización, el vector se administra por medio de endoscopia o laparoscopia.

En otro ejemplo, la presente descripción contempla un método para tratar pacientes con carcinoma mamario que comprende un virus oncolítico que contiene el vector viral del gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa. En una realización, el vector se administra por inyección directa en el tumor.

40 La administración de un virus oncolítico que contiene el vector viral del gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa se puede realizar en cualquier tumor sólido o linfoma que sea accesible para la liberación intratumoral del gen de la alfa 1,3galactosiltransferasa. Por ejemplo, la administración intratumoral se describe en el documento de EE.UU. 7,820,628.

45 Métodos alternativos para liberar el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa también se pueden realizar con cualquier tipo de vector viral y no viral que pueda liberar genes. Por ejemplo, estos métodos incluyen, pero no se limitan a vectores de adenovirus, virus auxiliar de adenovirus, vectores de retrovirus, vectores de lentivirus, vectores de ADN desnudo, virus del herpes o vectores de ARN desnudo o vectores de ADN.

50 En otro ejemplo, la presente descripción contempla un método para administrar vectores que contienen el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa mediante inyección en lesiones de melanoma o cualquier otra lesión tumoral, por lo que los epítomos se insertan en las membranas de las células tumorales. Como en el caso de las células tumorales transducidas con un virus oncolítico que contiene el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa, la IgG anti-Gal se unirá a las membranas de células tumorales que expresan epítomos alfa-gal y las dirigirá a células presentadoras de antígeno para provocar una respuesta inmunitaria sistémica también contra lesiones tumorales no tratadas que expresan los antígenos tumorales. Un experto en la técnica debería reconocer que la presente invención contempla la generación de inmunidad antitumoral adaptativa, conducida por la dirección del anticuerpo anti-Gal a las células presentadoras de antígeno por cualquier composición introducida en la masa tumoral que da como resultado la unión *in situ* de este anticuerpo natural a las células tumorales.

55

A) Administración

5 Los virus de la invención se pueden utilizar en un paciente, preferiblemente un paciente humano, que necesita tratamiento. Un paciente que necesita tratamiento es un individuo que padece cáncer, preferiblemente un individuo con un tumor sólido. El objetivo del tratamiento terapéutico es mejorar la condición de un paciente. Típicamente, el tratamiento terapéutico que utiliza un virus de la invención alivia los síntomas del cáncer.

Según un ejemplo adicional, se describe un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus de la invención a un paciente que padece cáncer o que tiene una neoplasia o un tumor que necesita tratamiento.

10 Según un aspecto de la invención, se proporciona un virus oncolítico como se define en la presente memoria o una composición farmacéutica como se define en la presente memoria para uso en el tratamiento del cáncer.

15 La administración de un virus oncolítico de la invención a un individuo que padece un tumor matará típicamente las células del tumor, disminuyendo así el tamaño del tumor y/o previniendo la propagación de células malignas del tumor mientras que también se reclutan células presentadoras de antígeno (APC) al sitio del tumor y se induce una respuesta inmunitaria antitumoral protectora.

Un método para administrar la terapia consiste en combinar el virus con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica.

20 Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato. Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden administrar utilizando vías de administración convencionales para promover la infección viral en un sitio del tumor. Las composiciones se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subcutánea), inhalación o insuflación (por ejemplo, a través de la boca o la nariz por vía transmucosa o intranasal) o por vía oral, bucal, parenteral o rectal.

25 La composición se puede administrar por inyección directa en el tejido diana que puede ser el tumor o un vaso sanguíneo que alimenta el tumor. La cantidad de virus administrado está en el caso de VHS en el intervalo de 10^4 a 10^{10} unidades formadoras de placa (ufp), preferiblemente de 10^5 a 10^8 ufp, más preferiblemente de aproximadamente 10^6 a 10^8 ufp. Típicamente, se utilizarían para inyección hasta 500 μ l, típicamente de 1 a 200 μ l, preferiblemente de 1 a 10 μ l de una composición farmacéutica del virus y un vehículo o diluyente adecuado farmacéuticamente aceptable. Sin embargo, para algunas aplicaciones de terapia oncolítica, también se pueden utilizar volúmenes mayores, pero no se limitan a 10 ml, dependiendo del tumor y el sitio de inoculación.

30 Las vías de administración y las dosis descritas están pensadas solo como una guía, ya que un profesional experto podrá determinar fácilmente la vía óptima de administración y dosificación. La dosis se puede determinar según diversos parámetros, especialmente según la localización del tumor, el tamaño del tumor, la edad, el peso y el estado del paciente a tratar y la vía de administración. La dosificación y la frecuencia de dosificación se pueden optimizar primero de manera preclínica mediante el estudio de las propiedades del virus en cultivos de tejidos y en un modelo animal adecuado.

35 El virus se puede combinar con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica. Un vehículo adecuado para la mayoría de los virus sería una solución salina tamponada, tal como la solución salina tamponada con fosfato (PBS). La composición farmacéutica se formulará idealmente para permitir la administración de la dosis apropiada de virus en un volumen de hasta 1 ml, aunque puede haber casos en los que se administre un volumen de hasta 10 ml. En los casos en que los volúmenes de lesiones tumorales individuales se consideran demasiado pequeños para ser tratados con la dosis óptima, es posible que la dosis óptima se administre mediante el tratamiento de lesiones múltiples, cada una administrada con una fracción de la dosis óptima total. También se prevé que se pueden requerir dosis múltiples para provocar una respuesta antitumoral efectiva. El intervalo de dosis se puede determinar en función de los datos de eficacia obtenidos en modelos preclínicos o de la experiencia clínica obtenida con una cepa de virus similar.

40 Preferiblemente, el virus se administra por inyección directa en el tumor. El virus también se puede administrar por vía sistémica o por inyección en un vaso sanguíneo que alimenta el tumor. El virus también se puede administrar como un tratamiento intravesical; tal como podría ser utilizado para el tratamiento de los cánceres de vejiga. La vía óptima de administración dependerá de la localización y el tamaño del tumor.

45 En un ejemplo, el método es un método para tratar a un individuo que tiene una neoplasia que comprende administrar una cantidad efectiva de un virus oncolítico modificado que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima galactosil transferasa.

50 Por lo tanto, los virus oncolíticos de la presente invención se pueden formular para su administración mediante, por ejemplo, inyección, inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz) o mediante administración oral, bucal, parenteral o rectal.

B) Indicaciones

5 En ejemplos específicos, los virus oncolíticos útiles en los presentes métodos se pueden administrar a un sujeto con carcinoma de próstata, mama, pulmón, hígado, endometrio, vejiga, colon o cervical; adenocarcinoma; melanoma; linfoma; glioma; o sarcomas tal como sarcomas de tejidos blandos y huesos.

10 En una realización adicional, la invención está dirigida a los virus oncolíticos modificados genéticamente de la invención para el tratamiento o la prevención del cáncer, que incluye, pero no se limita a, neoplasias, tumores, metástasis o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por el crecimiento celular descontrolado, y particularmente sus formas resistentes a múltiples fármacos. El cáncer puede ser un tumor multifocal. Los ejemplos de tipos de cáncer y trastornos proliferativos a tratar con los productos terapéuticos de la invención incluyen, pero no se limitan a, leucemia (p. ej., mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), linfoma (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, 15 cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia. En un ejemplo particular, los compuestos terapéuticos de la invención se administran a pacientes que tienen cáncer de próstata (p. ej., prostatitis, 20 hipertrofia prostática benigna, hiperplasia prostática benigna (HPB), paraganglioma prostático, adenocarcinoma prostático, neoplasia intraepitelial prostática, fístulas prostático-rectales y lesiones del estroma prostático atípicas). El tratamiento y/o la prevención del cáncer incluyen, pero no se limitan a, aliviar los síntomas asociados con el cáncer, la inhibición de la progresión del cáncer, la promoción de la regresión del cáncer y la promoción de la respuesta inmunitaria.

25 Como se utiliza en la presente memoria, el término neoplasma se refiere a un crecimiento anormal de tejido. Una neoplasia puede ser benigna o maligna. En general, una neoplasia maligna se conoce como cáncer. Los cánceres difieren de las neoplasias benignas en la capacidad de las células malignas para invadir otros tejidos, ya sea por crecimiento directo en tejido adyacente mediante invasión o por implantación en sitios distantes por metástasis (es decir, transporte a través de la sangre o el sistema linfático).

30 Los métodos de la presente descripción son adecuados para el tratamiento de neoplasias benignas y malignas (cáncer).

35 Como se define en la presente memoria, una neoplasia superficial es una que se encuentra en la superficie externa del cuerpo que se ha limitado y no se disemina a los tejidos circundantes u otras partes del cuerpo. Una neoplasia interna está localizada en un órgano interno u otra parte interna del cuerpo. Una neoplasia invasiva es una neoplasia que ha comenzado a atravesar las barreras tisulares normales e invadir las áreas circundantes, por ejemplo, un cáncer de mama invasivo que se ha diseminado más allá de los conductos y los lóbulos.

40 Una lista no exclusiva de los tipos de neoplasmas contemplados para el tratamiento por el método descrito en la presente memoria incluye las siguientes categorías: (a) neoplasias abdominales que incluyen neoplasias peritoneales y neoplasias retroperitoneales; (b) neoplasias óseas que incluyen neoplasias femorales, neoplasias del cráneo, neoplasias maxilares, neoplasias mandibulares, neoplasias maxilares, neoplasias del paladar, neoplasias de la nariz, neoplasias orbitales, neoplasias de la base del cráneo y neoplasias de la columna vertebral; (c) neoplasias mamarias que incluyen neoplasias mamarias masculinas, carcinoma ductal de mama y tumor phyllodes; (d) neoplasias del sistema digestivo que incluyen neoplasias del tracto biliar, neoplasias del conducto biliar, neoplasias del conducto biliar común, neoplasias de la vesícula biliar, neoplasias gastrointestinales, neoplasias esofágicas, neoplasias intestinales, 45 neoplasias cecales, neoplasias apendiculares, neoplasias colorrectales, poliposis adenomatosa coli colorrectal, síndrome de Gardner colorrectal, neoplasias colónicas, poliposis adenomatosa coli colónica, síndrome de Gardner colónico, neoplasias sigmoideas, neoplasias colorrectales hereditarias sin poliposis, neoplasias rectales, neoplasias del ano, neoplasias duodenales, neoplasias ileales, neoplasias yeyunales, neoplasias de estómago, neoplasias hepáticas, adenoma de células hepáticas, carcinoma hepatocelular, neoplasias pancreáticas, adenoma de células de los islotes, insulinoma, carcinoma de células de los islotes, gastrinoma, glucagonoma, somatostatina, vipoma, carcinoma ductal pancreático y neoplasias peritoneales; (e) neoplasias de las glándulas endocrinas, que incluyen neoplasias de las glándulas suprarrenales, neoplasias de la corteza suprarrenal, adenoma adrenocortical, carcinoma adrenocortical, neoplasia endocrina múltiple, neoplasia endocrina múltiple tipo 1, neoplasia endocrina múltiple tipo 2a, neoplasia endocrina múltiple tipo 2b, neoplasias de ovario, tumor de células de la granulosa, luteoma, síndrome de Meigs, tumor de células de Sertoli-Leydig de ovarios, tecoma, neoplasias pancreáticas, síndromes endocrinos paraneoplásicos, neoplasias paratiroideas, neoplasias hipofisarias, síndrome de Nelson, neoplasias testiculares, tumor de células de Sertoli-Leydig testicular y neoplasias tiroideas, (f) neoplasias oculares, que incluyen neoplasias conjuntivales, neoplasias orbitales, neoplasias retinianas, retinoblastoma, neoplasias uveales, neoplasias coroides y neoplasias del iris; (g) neoplasias cerebrales, de cabeza y cuello, que incluyen neoplasias esofágicas, neoplasias faciales, neoplasias de párpados, neoplasias maxilares, neoplasias gingivales, leucoplasia oral, leucoplasia vellosa, 55 neoplasias labiales, neoplasias palatinas, neoplasias de glándulas salivales, neoplasias parótidas, neoplasias de glándulas sublinguales, neoplasias de glándulas submandibulares, neoplasias de lengua, neoplasias

otorrinolaringológicas, neoplasias de oído, neoplasias laríngeas, neoplasias nasales, neoplasias del seno paranasal, neoplasias del seno maxilar, neoplasias faríngeas, neoplasias hipofaríngeas, neoplasias nasofaríngeas, neoplasias nasofaríngeas, neoplasias orofaríngeas, neoplasias amigdalinas, neoplasias paratiroideas, neoplasias tiroideas y neoplasias traqueales; (h) neoplasias hematológicas que incluyen neoplasias de médula ósea; (i) neoplasias del sistema nervioso, que incluyen, neoplasias del sistema nervioso central, neoplasias cerebrales, neoplasias del ventrículo cerebral, neoplasias del plexo coroideo, papiloma del plexo coroideo, neoplasias infratentoriales, neoplasias del tronco encefálico, neoplasias cerebelosas, neurocitoma, pinealoma, neoplasias supratentoriales, neoplasias hipotalámicas, neoplasias hipofisarias, síndrome de Nelson, neoplasias del nervio craneal, neoplasias del nervio óptico, glioma del nervio óptico, neuroma acústico, neurofibromatosis 2, síndromes paraneoplásicos del sistema nervioso, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, encefalitis límbica, mielitis transversa, degeneración cerebelar paraneoplásica, polineuropatía paraneoplásica, neoplasias del sistema nervioso periférico, neoplasias del nervio craneal, neuroma acústico y neoplasias del nervio óptico; (j) neoplasias pélvicas; (k) neoplasias de la piel que incluyen acantoma, neoplasias de las glándulas sebáceas, neoplasias de las glándulas sudoríparas y carcinoma de células basales; (l) neoplasias de tejidos blandos que incluyen neoplasias musculares y neoplasias vasculares; (m) neoplasias esplénicas; (n) neoplasias cardíacas, que incluyen neoplasias del corazón, neoplasias mediastínicas, neoplasias del tracto respiratorio, neoplasias bronquiales, neoplasias pulmonares, carcinoma broncogénico, carcinoma pulmonar de células no pequeñas, lesión en moneda pulmonar, síndrome de Pancoast, blastoma pulmonar, hemangioma esclerosante pulmonar, neoplasias pleurales, derrame pleural maligno, neoplasias traqueales, neoplasias del timo y timoma; o) neoplasias urogenitales que incluyen neoplasias de genitales femeninos, neoplasias de las trompas de falopio, neoplasias uterinas, neoplasias del cuello uterino, neoplasias endometriales, carcinoma endometriode, tumores del estroma endometrial, sarcoma del estroma endometrial, neoplasias vaginales, neoplasias vulvares, neoplasias de genitales masculinos, neoplasias de pene, neoplasias prostáticas, neoplasias testiculares, neoplasias urológicas, neoplasias de la vejiga, neoplasias renales, carcinoma de células renales, nefroblastoma, síndrome de Denys-Drash, síndrome de WAGR, nefroma mesoblástico, neoplasias ureterales y neoplasias uretrales; (p) y otros cánceres, que incluyen carcinoma renal, cáncer de pulmón, melanoma, leucemia, esófago de Barrett, metaplasia de células precancerosas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con otros tipos de estrategias de tratamiento del cáncer (p. ej., radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes antitumorales). Los ejemplos de agentes antitumorales incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa I (p. ej., CPT-11, topotecan, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal y taxo.

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención.

Ejemplo 1: descripción de estudios preliminares para la expresión de epítomos alfa-gal en células tumorales mediante transducción con un vector de adenovirus que contiene el gen $\alpha 1,3GT$

La inducción de la expresión de epítomos alfa-gal (Gal-alfa1-3Gal-beta1-4GlcNAc-R) en células tumorales humanas se estudió previamente mediante transducción con un vector de adenovirus defectuoso de replicación que contiene el gen de la $\alpha 1,3GT$ como se detalla en Deriy *et al.* Glycobiology 2002, 12: 135-144. Para este propósito, el marco de lectura abierto (ORF) del ADNc de alfa 1,3GT de ratón se insertó en un vector de adenovirus defectuoso para la replicación, en el que se eliminaron los genes E1 y E3 de los genes tempranos. Esto se logró mediante el uso del plásmido lanzadera pAd que contiene el ADNc de alfa 1,3GT que permite la recombinación homóloga del ADNc en el vector de adenovirus defectuoso para la replicación. En este plásmido, el gen de la $\alpha 1,3GT$ se insertó secuencia abajo del promotor de citomegalovirus (CMV), que es un promotor muy eficaz en células de mamíferos. El vector de adenovirus generado que contiene el gen de la $\alpha 1,3GT$ de ratón insertado bajo el promotor de CMV se propagó en la línea celular de riñón humana 293 (ATCC) que contiene el gen viral complementario E1. El clon viral aislado se analizó para determinar la presencia de un ADNc de $\alpha 1,3GT$ que produce una enzima catalíticamente activa, mediante la transducción de células 293 y el análisis de la expresión del epítomo alfa-gal después de 24 h mediante citometría de flujo después de la unión de *Bandeiraea simplicifolia* IB4 (lectina BS). La lectina BS se une específicamente a los epítomos alfa-gal.

La replicación de adenovirus defectuoso en contacto con el gen de la $\alpha 1,3GT$ se designó como Ad αGT y se propagó adicionalmente en la línea celular 293 que contiene el gen viral complementario E1. La concentración de Ad αGT se determinó como una multiplicidad de unidades de infección (MOI) y se definió como la dilución más alta del vector de adenovirus que mostró efectos citopáticos en células 293, 6 días después de la infección. La capacidad de Ad αGT para inducir la síntesis y la expresión de epítomos alfa-gal en células tumorales humanas se estudió con la línea celular HeLa de carcinoma cervical humano, que al igual que otras células humanas malignas o normales, carece de epítomos alfa-gal.

La transducción de células HeLa dio como resultado la penetración inmediata de ~20 copias de Ad αGT en cada célula. La aparición de un ARNm de $\alpha 1,3GT$ que se origina a partir de Ad αGT se determinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando cebadores secuencia arriba y secuencia abajo específicos para el gen de la $\alpha 1,3GT$ de ratón (5'-ATGAATGTCAAGGAAAAG-3' (SEQ ID NO: 1) y 3'-TCAGACATTATTTCTAACCA-5' (SEC ID NO: 2)). En base a este análisis, se encontró un ARNm de $\alpha 1,3GT$ en el citoplasma de las células HeLa, 4 h después de la transducción. La apariencia real de la enzima $\alpha 1,3GT$ en el

citoplasma se determinó por la actividad catalítica de esta enzima. La α 1,3GT transfiere galactosa desde el azúcar donador UDP-Gal a nueve restos terminales de N-acetil lactosamina en cadenas de carbohidratos unidas a N de la proteína asialofetina que recubre los pocillos de ELISA. Los epítomos alfa-gal sintetizados *de novo* se identificaron mediante ELISA con el anticuerpo monoclonal anti-Gal M86 (Galili *et al.* Transplantation, 65: 1129-1132, 1998). Utilizando este ensayo, la actividad catalítica de α 1,3GT se detectó por primera vez en las células HeLa transducidas después de 6 h (véase la línea de tiempo en la Figura 3). La aparición inicial de los epítomos de a-gal se detectó mediante un ensayo de unión al anticuerpo anti-Gal M86 monoclonal sensible llamado ensayo de inhibición ELISA que mide el número de epítomos alfa-gal por célula (Galili *et al.*, *Supra*). Utilizando este ensayo, la expresión de los epítomos alfa-gal en la superficie celular HeLa se detectaron glicoconjugados 10 h después de la transducción a un nivel de 6×10^4 /célula. Dentro de las 48 h posteriores a la transducción, el número de epítomos alfa-gal expresados aumentó a 2×10^6 epítomos/célula. (Figura 3).

Dado que Ad α GT es defectuoso en la replicación y no puede proliferar al dividir las células, cada división celular de las células HeLa transducidas produce una disminución en el número de copias de α 1,3GT en un 50%. Por consiguiente, la expresión de los epítomos alfa-gal disminuye en la superficie de las células, de modo que dentro de las 2 semanas posteriores a la transducción no se detectan epítomos alfa-gal en las células y no se detecta un gen de la α 1,3GT dentro de las células.

Ejemplo 2: Expresión de epítomos alfa-gal en células de melanoma B16-BL6 transducidas con un vector de adenovirus que contiene el gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa

Para lograr la introducción del gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa en las células, este gen se insertó en un vector de adenovirus incompetente en la replicación como se describió anteriormente (Deriy *et al.* Glycobiology 2002, 12: 135). El vector resultante se denomina Ad α GT y es muy efectivo para inducir la expresión de epítomos alfa-gal en células tumorales humanas (Deriy L *et al.*, *supra*). La expresión de los epítomos alfa-gal se determinó en células de melanoma B16-BL6 transducidas con Ad α GT. Estas células son un subclón del melanoma B16 y se conocen como células BL6. La transducción de células BL6 con Ad α GT da como resultado la producción intracelular de alfa 1,3-galactosiltransferasa que está codificada por el gen de alfa 1,3-galactosiltransferasa dentro de la Ad α GT transductora. La expresión *de novo* de los epítomos alfa-gal en glicoconjugados de la superficie celular después de la síntesis de este epítomo por la alfa 1,3-galactosiltransferasa se evaluó 48 horas después de la transducción. Los epítomos alfa-gal se detectaron mediante la unión de lectina *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* IB4 (lectina BS - una lectina específica para epítomos α -gal) medida por citometría de flujo y por la unión del anticuerpo anti-Gal a las células transducidas como se midió por ELISA. Las células BL6 transducidas con Ad α GT (denominadas células BL6_{Ad α GT}) mostraron un cambio significativo después de la unión a la lectina BS, medida por citometría de flujo, en comparación con las células B16 transducidas con el adenovirus de control "vacío" que carece del inserto del gen alfa1,3-galactosiltransferasa (denominado células BL6_{Adcont}) (Figura 4A). Además, ~15% de las células BL6_{Ad α GT} mostraron un grado mucho mayor de unión a lectina que el resto de la población, lo que indica que estas células expresan epítomos alfa-gal en altos números de epítomos por célula.

La capacidad de la IgG anti-Gal de ratón para unirse a los epítomos alfa-gal en células BL6_{Ad α GT} se demostró mediante ELISA (Figura 4B). Las células BL6_{cont} o las células BL6_{Ad α GT} se unieron a los pocillos de ELISA mediante secado. Posteriormente, se añadió suero que contenía IgG anti-Gal a diluciones dobles en serie a los pocillos y la unión de IgG anti-Gal se determinó mediante la unión del anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Los valores de unión de IgG no específicos se restaron mediante la medición paralela de la unión de IgG a los pocillos recubiertos con células BL6 no transducidas. Anti-Gal se unió fácilmente a las células BL6_{Ad α GT} incluso a una dilución de suero de 1:128, mientras que no se observó unión en los pocillos recubiertos con células BL6_{Adcont} en ninguna de las diluciones de suero (Figura 4B).

Ejemplo 3: Eficacia de las células BL6_{Ad α GT} para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora

La eficacia de las células tumorales transducidas con Ad α GT como vacunas se estudió en ratones knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa, como se detalla en Deriy *et al.* Cancer Gene Therapy 12: 528-539, 2005). Las células B16-BL6 sirvieron como modelo tumoral. Los ratones que producen anti-Gal se vacunaron con 2×10^6 células BL6_{Ad α GT} irradiadas, o con 2×10^6 células BL6 irradiadas que se transdujeron con el vector de adenovirus parental control que carece del gen de la alfa 1,3-galactosiltransferasa. Las últimas células, denominadas BL6_{Adcont}, no expresaron epítomos alfa-gal y sirvieron para la inmunización de los ratones control. La inmunización se repitió después de una semana. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones se provocaron por vía subcutánea con $0,2 \times 10^6$ ó $0,5 \times 10^6$ células BL6 vivas. El desarrollo del tumor se monitorizó durante 2 meses. Dos tercios de los ratones inmunizados con células BL6_{Ad α GT} y expuestos a $0,2 \times 10^6$ células BL6 parentales no transducidas estaban protegidos contra la provocación, mientras que solo el 20% del grupo de control no desarrolló tumor (Figura 5A). Cuando los ratones se provocaron con la dosis más alta de $0,5 \times 10^6$ células BL6 vivas, un tercio de los ratones inmunizados con células BL6_{Ad α GT} desarrollaron protección contra la provocación del tumor, mientras que todos los ratones control vacunados con células BL6 transducidas con el virus de control Ad_{cont}, desarrollaron tumores dentro de los 25 días después de la provocación con células BL6 (Figura 5B). Estos resultados implican que las células tumorales transducidas con Ad α GT que expresan epítomos alfa gal pueden servir como vacunas tumorales que se dirigen de manera efectiva a las células presentadoras de antígeno y, por lo tanto, pueden inducir una respuesta inmunitaria contra las mismas células tumorales, que carecen de epítomos alfa-gal.

Ejemplo 4: Cinética de la expresión del epítipo alfa-gal frente a la citólisis en células tumorales infectadas con el virus del herpes que contiene el gen de la $\alpha 1,3GT$ (VHS $_{\alpha GT}$)

5 El objetivo de este experimento es determinar *in vitro* la línea de tiempo para la expresión de epítipos alfa-gal en células tumorales humanas y de ratón después de la infección de las células con el virus del herpes oncolítico que contiene el gen de la $\alpha 1,3GT$ (VHS $_{\alpha GT}$). Este análisis es necesario para confirmar que la expresión de epítipos alfa-gal en células infectadas se produce antes de la citólisis de las células por este virus oncolítico. Se supone que una vez que los epítipos alfa-gal se expresan en las membranas celulares, se unirán al anticuerpo anti-Gal natural incluso después de que las células se hayan lisado por el virus oncolítico VHS $_{\alpha GT}$. Los complejos inmunitarios formados entre
10 las membranas de células tumorales anti-Gal y fragmentadas (debido a la lisis celular) se dirigirán de manera efectiva a la captación por APC, tal como las células dendríticas y los macrófagos, como resultado de la interacción entre la porción Fc del anticuerpo anti-Gal inmunocomplejado y los receptores Fc γ (Fc γ R) en APC (véase Figuras 1 y 2). Para preparar VHS $_{\alpha GT}$, el gen de la $\alpha 1,3GT$ bajo el promotor de CMV se amplifica mediante PCR a partir del virus defectuoso de replicación Ad αGT descrito anteriormente y en (Deriy *et al* 2002, *supra*). El gen bajo el promotor de CMV se inserta en un VHS oncolítico y las suspensiones del VHS $_{\alpha GT}$ resultante se preparan mediante propagación en células HeLa según métodos conocidos por los expertos en la técnica.

La expresión de los epítipos alfa-gal se determina en células de melanoma de ratón B16F10 (B16) infectadas con VHS $_{\alpha GT}$ y en células de carcinoma cervical HeLa humanas. El estudio con las células de melanoma de ratón es necesario para determinar la viabilidad posterior del estudio *in vivo* con estas células en ratones. El melanoma B16 es
20 la única línea celular tumoral de ratón conocida que carece de epítipos alfa-gal y, por lo tanto, simula células tumorales humanas en la falta de este epítipo de carbohidratos. El estudio con las células HeLa es necesario para confirmar que la suposición de que la expresión del epítipo alfa-gal en células tumorales humanas infectadas con VHS $_{\alpha GT}$ se produce antes de la citólisis de las células por este virus. El estudio se describe para las células B16, pero también es idéntico para las células HeLa.

25 Se añade una suspensión de virus VHS $_{\alpha GT}$ a las monocapas de células B16 a una concentración de 1×10^6 - 2×10^7 ufp (unidades formadoras de placa)/ml. Las células infectadas se separan cada 2 horas y la expresión del gen de la $\alpha 1,3GT$ del virus se determina por la aparición de un ARNm de la $\alpha 1,3GT$. Este ARNm se detecta mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando cebadores secuencia arriba y secuencia abajo específicos del gen de la $\alpha 1,3GT$ de ratón (5'-ATGAATGTCAAGGGAAAAG-3' (SEQ ID NO: 1) y 3'-TCAGACATTATTTCTCCACA-5' (SEQ ID NO: 2)) como se describió para Ad αGT anteriormente. La apariencia real de la enzima $\alpha 1,3GT$ en el citoplasma de las células infectadas se determina por la actividad catalítica de esta enzima en ELISA utilizando asialofetina como un aceptor para la enzima y se utiliza UDP-Gal como donador de azúcar. Además, la asialofetina funciona como un antígeno en fase sólida que recubre los pocillos de ELISA. Los epítipos alfa-gal sintetizados *de novo* se identifican mediante ELISA con el anticuerpo monoclonal anti-Gal M86 (Galili, 1998, *supra*).
30 La aparición posterior de epítipos alfa-gal se detecta mediante la unión de lectina de *Bandeiraea* (Griffonia) simplicifolia IB4 (lectina BS - una lectina específica para epítipos alfa-gal) medida por citometría de flujo y por la unión del anticuerpo anti-Gal a las células infectadas procesadas para recubrir ELISA secando las células en pocillos de ELISA. La expresión del epítipo alfa-gal se cuantifica además mediante el ensayo de unión del anticuerpo monoclonal sensible anti-Gal M86 denominado ensayo de inhibición ELISA, que mide el número de epítipos alfa-gal por célula (Galili *et al.*, 1998, *supra*). Se utiliza un VHS "vacío" (es decir, un virus que carece del gen de la $\alpha 1,3GT$) como control para la infección viral.

Los cultivos celulares continúan siendo monitorizados microscópicamente para determinar la citólisis con el fin de determinar el período posterior a la infección en el que las células se someten a la citólisis.

Ejemplo 5: Eficacia de VHS $_{\alpha GT}$ como un virus oncolítico *in situ*

45 La eficacia de VHS $_{\alpha GT}$ como virus oncolítico y como medio para generar inmunidad antitumoral protectora contra varios antígenos asociados a tumores (TAA) se determina según los estudios (Galili *et al.* J Immunol.; 178: 4676-87, 2007; Abdel -Motal *et al.* Cancer Immunol Immunol.; 58: 1545-55, 2009). Estos estudios se realizan en ratones knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa que producen el anticuerpo anti-Gal. Las células B16 sirven como modelo tumoral. Los ratones knockout para la alfa1,3-galactosiltransferasa que producen anti-Gal se inyectan por vía subcutánea en el flanco abdominal derecho con 1×10^6 células B16. Como resultado de esta inyección, las células B16 se convierten en una lesión tumoral de melanoma con un diámetro de 4 a 5 mm en 5-6 días. Se inyecta VHS $_{\alpha GT}$ en una cantidad que oscila entre 10^3 y 10^6 ufp en un volumen de 0.1 ml en los tumores. El VHS oncolítico que carece del gen de la $\alpha 1,3GT$ insertado (VHS "vacío") se utiliza como virus de control incapaz de inducir la expresión de epítipos α -gal. Los ratones se monitorizan durante 2 meses para detectar la desaparición de la lesión tumoral. Los ratones con tumores que alcanzan el diámetro de 20 mm se someten a eutanasia. La cantidad de VHS $_{\alpha GT}$ que es el doble de la cantidad que muestra la eliminación completa del tumor (es decir, 100% de oncolisis) se determina y se utiliza para estudios adicionales que evalúan la respuesta inmunitaria antitumoral protectora provocada por este tratamiento. La comparación con el VHS de control que carece del gen de la $\alpha 1,3GT$ determina si el VHS $_{\alpha GT}$ es más o menos eficaz que el virus de control para inducir la oncolisis.

60 Ejemplo 6: Eficacia de las lesiones infectadas con VHS $_{\alpha GT}$ para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora contra metástasis distante

Los ratones knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa que producen anti-Gal se inyectan subcutáneamente en el flanco abdominal derecho con 1×10^6 células B16 y subcutáneamente en el flanco izquierdo con 1×10^4 , 1×10^5 o 1×10^6 células B16. El tumor que se desarrolla en el flanco izquierdo representa una metástasis distante que no se puede convertir en una lesión tumoral si la inyección de VHS $_{\alpha GT}$ en la lesión del flanco derecho lo convierte en una vacuna que provoca una respuesta sistémica antitumoral protectora. Cuando el tumor del flanco derecho alcanza el tamaño (diámetro) de 4-5 mm (dentro de 5-6 días), se inyecta con 0.1 ml de suspensión VHS $_{\alpha GT}$ en una cantidad que es el doble de la cantidad que induce el 100% de citólisis de la lesión de melanoma. El VHS oncolítico que carece del gen de la $\alpha 1,3GT$ insertado se utiliza como virus de control incapaz de inducir la expresión de epítopos alfa-gal. El crecimiento del tumor en el flanco izquierdo se controla durante 2 meses. La conversión del tumor inyectado con VHS $_{\alpha GT}$ en una vacuna da como resultado la prevención de que las metástasis distantes en el flanco izquierdo se conviertan en una lesión detectable cuando el flanco izquierdo se inyecta con 1×10^4 , 1×10^5 o 1×10^6 células B16. Se piensa que la prevención del crecimiento tumoral es más efectiva (es decir, la prevención de que un mayor número de células tumorales se convierta en una lesión en el flanco izquierdo) cuando se inyecta VHS $_{\alpha GT}$ en el tumor en el flanco derecho que en el VHS que carece del gen $\alpha 1,3GT$.

Ejemplo 7: Eficacia de las lesiones infectadas con VHS $_{\alpha GT}$ para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora contra células tumorales provocadoras

Los ratones knockout para la alfa 1,3-galactosiltransferasa que producen anti-Gal se inyectan por vía subcutánea en el flanco abdominal derecho con 1×10^6 células B16. Cuando el tumor alcanza el tamaño (diámetro) de 4-5 mm (dentro de 5-6 días) se inyecta con 0.1 ml de suspensión VHS $_{\alpha GT}$ en una cantidad que es el doble de la cantidad que induce el 100% de la citólisis de la lesión de melanoma. El VHS oncolítico que carece del gen de la $\alpha 1,3GT$ insertado se utiliza como virus de control incapaz de inducir la expresión de epítopos alfa-gal. Tres semanas después de la inyección del virus oncolítico en la lesión del flanco derecho, el flanco izquierdo se inyecta con 0.3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^6 o 10×10^6 células B16 como provocación tumoral. La inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral protectora como resultado de la inyección de VHS $_{\alpha GT}$ en el tumor del flanco derecho (que convierte el tumor en una vacuna) resulta en la prevención de que las células tumorales provocadoras en el flanco izquierdo se conviertan en una lesión tumoral. La prevención del crecimiento tumoral es más efectiva (es decir, la prevención de que un mayor número de células tumorales provocadoras se conviertan en una lesión) cuando el tumor en el flanco derecho se inyecta con VHS $_{\alpha GT}$ que con VHS que carece del gen $\alpha 1,3GT$.

Ejemplo 8: Producción y eficacia de un adenovirus oncolítico competente para la replicación que codifica un gen funcional de la alfa 1,3-galactosiltransferasa

El presente estudio describe la producción de un Ad5/3- $\Delta 24$ - αGT CRAd (CRAd- αGT), en el que el gen E3 se reemplazó con el gen murino alfa 1,3-galactosiltransferasa ($\alpha 1,3GT$). La $\alpha 1,3GT$ sintetiza el antígeno carbohidrato galactosa-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetil-glucosamina-R (alfa-gal). Cuando el virus se replica, la proteína $\alpha 1,3GT$ se produce junto con las proteínas virales, la proteína αGT cataliza posteriormente la producción de alfa-gal. La superficie celular alfa-gal está complejada por anticuerpos anti-Gal, que promueven la activación inmunitaria y la captación de los complejos inmunitarios por las células presentadoras de antígeno.

Materiales y métodos

Líneas celulares

Las líneas celulares A549 (carcinoma de pulmón humano) y A375 (melanoma humano) se adquirieron de la Colección Europea de Cultivos Celulares Autenticados (ECCAC). Las células A549 se mantuvieron en F-12K + 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés). Las células A375 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) + 10% de suero bovino fetal. Ambas líneas celulares se incubaron a una temperatura de 37°C y 5% de CO₂.

Producción de virus

La producción de virus se realizó bajo contrato por Imanis Life Sciences (Rochester, Minneapolis, EE.UU.). La construcción del virus se realizó utilizando lanzaderas establecidas y plásmidos adenovirales grandes y métodos de ADN recombinante exactamente como se describe en detalle (Danthinne y Werth, 2000; Danthinne, 2001). Para crear el CRAd- αGT , el gen murino de la $\alpha 1,3GT$ de 1.1Kb (número de registro de GenBank M85153) fue sintetizado por Integrated DNA Technologies (IDT) y clonado en un vector lanzadera Ad5 E3 con un promotor de CMV 5' de la secuencia de la $\alpha 1,3GT$. En un cósmido que codifica el genoma de Ad5, con la secuencia del botón de fibra reemplazada con la de Ad3, la secuencia de 24 pb que codifica la secuencia de aminoácidos de LTCHEAGF (SEC ID NO: 3) se eliminó de la región E1a. La secuencia E3 se eliminó del cósmido Ad5/3 y se reemplazó con la secuencia de CMV- αGT , subclonada desde el vector lanzadera. Para crear un control, CRAd, la secuencia que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) se sintetizó mediante IDT y se clonó en un vector lanzadera Ad5 E1 con un promotor de CMV 5' de la secuencia de GFP. La secuencia E1 se eliminó del cósmido Ad5/3 y se reemplazó con la secuencia CMV-GFP, subclonada desde el vector lanzadera. La región E3 fue eliminada. Las estructuras de los virus quiméricos se muestran en la Figura 6.

Las células HEK 293 se transfectaron con los cósmidos de virus quiméricos y, después de 48 horas de incubación, se

5 prepararon lisados brutos. Para la amplificación del virus, las células HEK 293 se sembraron en placas de 15 cm y se incubaron durante la noche a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se infectaron con el lisado bruto de las células infectadas con virus y se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂, después de lo cual se recolectaron las células y el sobrenadante.

10 Las partículas de virus se liberaron de las células infectadas mediante tres ciclos de congelación y descongelación y se recuperaron del sobrenadante celular mediante precipitación con sulfato de amonio (Schagen *et al.*, 2000). La purificación del virus se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (CsCl). Brevemente, la preparación de virus en bruto se cargó en un gradiente de CsCl de dos etapas en un tubo de centrifuga Beckman SW28 y se centrifugó durante 2 horas a 20,000 rpm. La banda del virus se recogió y se cargó en un gradiente continuo de CsCl y se centrifugó nuevamente. La banda de virus final se recogió y se dializó inmediatamente contra 4 x 0.5 L de tampón GTS (2.5% de glicerol, NaCl 25 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0) durante 18 horas a una temperatura de 4°C. Se recogieron aproximadamente 1 ml de suspensión de virus dializado y se filtraron a través de una membrana Supor de 0.22 µm (Pall) y después se congelaron a una temperatura de -70°C.

15 La concentración de virus se determinó utilizando el método OD260-SDS y el coeficiente de extinción de 1.1×10^{12} partículas de virus (VP) por 260 unidades de absorbancia en presencia de SDS. Se encontró que las concentraciones de virus eran 3.6×10^{12} VP/ml para CRAd-αGT y 2.9×10^{12} VP/ml para CRAd-GFP. La pureza de las preparaciones de virus se determinó mediante las proporciones A260/A280 y A320/A260 y se encontró que estaba dentro del intervalo asociado con el virus puro (1.2 a 1.4 y 0.22 a 0.27 respectivamente) para ambos virus.

20 El título del virus se determinó mediante un ensayo de punto final de la dilución (DICT50) utilizando el método Reed-Muench bien establecido (Reed y Muench, 1938). Brevemente, las células HEK293 se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron durante la noche a una temperatura de 37°C. Al día siguiente, se añadieron a las células HEK293 sembradas unas diluciones seriadas con un factor de dilución de 10 de la solución madre viral purificada con CsCl y las células se incubaron a una temperatura de 37°C, con 5% de CO₂ durante 14 días. Los pocillos se puntuaron por la presencia de efectos citopáticos (CPE, por sus siglas en inglés) mediante evaluación visual bajo el microscopio y el TCID50 se calculó utilizando la ecuación de Reed-Muench (Reed y Muench, 1938). Se determinó que el título del virus era 6.8×10^{11} DICT50/ml para CRAd-αGT y 2.7×10^{11} DICT50/ml para CRAd-GFP.

Determinación de la muerte celular por CRAd-αGT

30 Las monocapas sub-confluentes de células A549 y A375 se recolectaron de matraces de cultivo tisulares utilizando una solución de disociación celular (CDS, Sigma-Aldrich). Las células se contaron utilizando un hemocitómetro y las células vivas se distinguieron de las muertas por exclusión de azul de tripán. Las células se diluyeron en medio de cultivo y se añadieron a placas de cultivo tisular blancas de 96 pocillos estériles a 90 µl/pocillo para dar 5×10^3 o 1×10^4 células/pocillo.

35 Cada virus se diluyó 1:3 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) + 10% de FBS para proporcionar soluciones madre de trabajo de 1.2×10^{12} VP/ml para CRAd-αGT y 9.67×10^{11} VP/ml para CRAd-GFP. Las soluciones madre de trabajo se diluyeron en serie 1 en 5 en PBS + 10% de FBS para generar unas series de titulación de 1.2×10^{12} - 1.2×10^5 VP/ml para CRAd-αGT y 9.67×10^{11} - 9.9×10^4 para CRAd-GFP. Las series de titulación se diluyeron 1:10 en las placas de ensayo (10 µl por pocillo de virus a las células sembradas 90 µl) y las placas se incubaron durante 72 horas a una temperatura de 37°C/5% de CO₂.

40 La viabilidad celular se determinó utilizando el reactivo de viabilidad celular luminiscente Cell Titre Glo (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y las placas se leyeron en un lector de placas EnVision 2102 (Perkin Elmer). Las unidades de luminiscencia sin procesar (RLU) se representaron frente al log de partículas virales/ml.

45 Para visualizar el efecto citolítico del virus CRAd-αGT, las células A549 y A375 sembradas en placas transparentes de 96 pocillos o de 24 pocillos, como se detalla anteriormente y a continuación, e infectadas con varias diluciones de CRAd-αGT y CRAd-GFP, nuevamente detalladas anteriormente y a continuación, se evaluaron bajo un microscopio óptico. Se tomaron imágenes de células con un YenCam 10 (Yenway) y un software de soporte.

Determinación de la unión de anti-Gal a células humanas cancerosas infectadas con Ad5/3-Δ24-αGT CRAd

50 Las células A549 y A375 se recolectaron de matraces de cultivo de tejidos como se describió anteriormente. Después del recuento, las células se diluyeron en medio de cultivo y se añadieron a placas de cultivo tisular de 24 pocillos en un volumen de 540 µl/pocillo, lo que equivalía a 3×10^4 células/pocillo.

55 Cada virus se diluyó 1:10.000 en PBS + 10% de FBS (1:100 y después 1:100) para proporcionar soluciones de 3.6×10^8 VP/ml para CRAd-αGT y 2.9×10^8 para CRAd-GFP. Estas soluciones se diluyeron 1:25 dos veces en PBS + 10% de FBS para dar concentraciones de virus de 1.44×10^7 y 5.8×10^5 VP/ml para CRAd-αGT y 1.16×10^7 y 4.6×10^5 VP/ml para CRAd-GFP. Las tres diluciones de virus se diluyeron 1:10 más en las células sembradas (60 µl de virus a 540 µl de células por pocillo). Se añadió un volumen igual de PBS + 10% de FBS solo a los pocillos que no tenían virus de control.

Las placas se incubaron durante 72 horas. Al final de la incubación, se determinó la presencia de antígeno alfa-gal en

la superficie de las células infectadas mediante citometría de flujo. Las células infectadas y no infectadas (sin virus control) se recolectaron de placas de 24 pocillos utilizando CDS, se lavaron en PBS + 0.5% de BSA y se incubaron con 40 µg/ml de anticuerpo anti-Gal IgG1 humano M86 monoclonal (Anticuerpo absoluto) diluido en PBS + 0,5% de BSA, a una temperatura de 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron con PBS + 0.5% de BSA y se analizaron en un citómetro de flujo Beckman Coulter FC500. Se utilizaron células sin tefir para establecer los voltajes de dispersión hacia adelante, dispersión lateral y canales fluorescentes 1 y 4. Se registraron las señales GFP (canal 1) y APC (canal 4) para las muestras de ensayo. Se utilizaron controles de un solo color para ajustar la compensación.

Resultados

10 CRAd-αGT lisa las células cancerosas humanas

Los efectos citolíticos de CRAd-αGT y CRAd-GFP control en células A549 y A375 se cuantificaron utilizando un ensayo de viabilidad celular basado en placa (Figura 7). La reducción en la viabilidad celular observada en los pocillos donde las células se infectaron con CRAd-αGT o CRAd-GFP era dependiente de la concentración del virus. El número de partículas de virus CRAd-αGT requeridas para reducir la viabilidad celular en un 50% fue menor que para el virus CRAd-GFP control. Esto está en línea con el título del virus medido por el ensayo TCID50 (véase la sección materiales y métodos más arriba).

El efecto citolítico de CRAd-αGT en células cancerosas humanas A549 y A375 se visualizó mediante microscopía óptica y se comparó con CRAd-GFP (Figura 8). Las células que se infectaron con CRAd-αGT o CRAd-GFP, y después se incubaron durante 72 horas, fueron eliminadas por ambos virus. Las células no infectadas estaban sanas, sin evidencia de lisis.

Las células infectadas con CRAd-αGT se unen a los anticuerpos anti-Gal

Para investigar si la infección de las células con CRAd-αGT da como resultado la expresión de una proteína α1,3GT catalíticamente activa y la subsiguiente expresión de alfa-gal en la superficie celular, la unión de anticuerpos anti-Gal específicos de alfa-gal a las células infectadas con CRAd-αGT se determinó y comparó con la unión de anticuerpos anti-Gal a CRAd-GFP y células no infectadas mediante citometría de flujo (Figura 9). Las células que se infectaron con CRAd-αGT se unieron fuertemente con anti-Gal, pero fueron negativas para la expresión de GFP. A la inversa, las células que se infectaron con CRAd-GFP fueron negativas para la unión de anti-Gal, pero fueron positivas para la expresión de GFP. Las células no infectadas fueron negativas tanto para la unión de anti-Gal como para la expresión de GFP.

30 Conclusiones

La infección de células humanas de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (A549) y melanoma (A375) con CRAd-αGT dio como resultado la lisis celular y la muerte. La lisis celular se produce como consecuencia de la replicación de CRAd-αGT, que es selectiva para las células cancerosas debido a la eliminación de la región de 24 pb del gen viral E1a (Fueyo *et al.*, 2000).

Además de la lisis celular, la infección de las células cancerosas con el CRAd-αGT dio como resultado la unión específica de los anticuerpos anti-Gal a la superficie celular, mientras que el anti-Gal no se unió a las células no infectadas o infectadas con CRAd-GFP. Como el anti-Gal se une específicamente al epítipo alfa-gal, podemos concluir que la replicación del CRAd-αGT en células cancerosas da como resultado la expresión de la enzima α1,3GT catalíticamente activa, que posteriormente cataliza la síntesis de alfa-gal.

La unión de anticuerpos anti-Gal a alfa-gal que expresan células tumorales muertas y restos de células tumorales, creados por el efecto oncolítico del virus, aumentará la respuesta inmunitaria adaptativa a los neoantígenos tumorales. Las células presentadoras de antígeno (APC) que llevan los receptores de activación Fcγ engullen los restos de células tumorales y las células muertas complejadas con IgG anti-Gal a través de los receptores de activación Fcγ. La activación de los receptores Fcγ en las APC conduce a la activación, maduración de APC y presentación mejorada del antígeno a las células T (Regnault *et al.*, 1999; Rafiq *et al.*, 2002; Platzer *et al.*, 2014).

Bibliografía

Bramante *et al.* (2015). *Int. J. Cancer* 137: 1775-1783.

Danthinne (2001). *Biotechniques* 30: 612-6, 618-9.

Danthinne and Werth (2000). *Gene Ther.* 7: 80-7.

50 Fueyo *et al.* (2000). *Oncogene* 19: 2-12.

Kanerva *et al.* (2013). *Clin. Cancer Res.* 19: 2734-2744.

Kanerva *et al.* (2003). *Mol. Ther.* 8: 449-458.

Kanno *et al.* (2012). *Anticancer Res.* 32: 4891-5.
 Kim *et al.* (2013). *Gynecol. Oncol.* 130: 518-24.
 Koski *et al.* (2010). *Mol. Ther.* 18: 1874-84.
 5 Platzter (2014). *Front. Immunol.* 5: 140.
 Rafiq *et al.* (2002). *J. Clin. Invest.* 110: 71-9.
 Reed and Muench (1938). *Am. J. Epidemiol.* 27: 493-497.
 Regnault *et al.* (1999). *J. Exp. Med.* 189: 371-80.
 Schagen *et al.* (2000). *Gene Ther.* 7: 1570-4.
 10 Sherr (1996). *Science* 274: 1672-7.
 Ulasov *et al.* (2006). *Hum. Gene Ther.* 17: 556-64.

Listado de secuencias

15 <110> AGALIMMUNE LIMITED
 <120> COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS DE USO PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER
 <130> AGA-C-P1835PCT
 20 <150> 1505860.5
 <151> 2015-04-07
 <160> 3
 25 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 35 <400> 1
 atgaatgtca agggaaaag 19
 <210> 2
 <211> 20
 40 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 45 <400> 2
 tcagacatta ttctaacca 20
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 3
 55 Leu Thr Cys His Glu Ala Gly Phe
 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica una enzima hexosil transferasa, en donde la enzima es una enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa.
- 5 2. El virus oncolítico según la reivindicación 1, que comprende un dominio de unión recombinante específico para un marcador de células madre tumorales.
3. El virus oncolítico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está limitado en cuanto a su replicación.
4. El virus oncolítico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un virus basado en ARN o ADN de origen humano o no humano, tal como adenovirus, herpesvirus, virus vaccinia, virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, parvovirus autónomos, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o reovirus.
- 10 5. El virus oncolítico según la reivindicación 4, que es un adenovirus, tal como un adenovirus de replicación condicional (CRAd).
6. El virus oncolítico según la reivindicación 5, que es un virus quimérico Ad5/3, que comprende opcionalmente una delección de 24 pares de bases ($\Delta 24$) en la región constante 2 (CR2) del gen viral inmediato temprano (E1a) (Ad5/3- $\Delta 24$ CRAd).
- 15 7. El virus oncolítico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un Ad5/3- $\Delta 24$ - α GT CRAd (CRAd- α GT).
8. Una composición farmacéutica que comprende el virus oncolítico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8, que está formulada para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratumoral, subcutánea, oral, rectal, intravaginal, intranasal, transmucosa o transdérmica.
10. Un virus oncolítico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición farmacéutica según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, para uso en el tratamiento del cáncer.
- 25 11. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en donde el cáncer se selecciona de leucemia (p. ej., mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), linfoma (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata,
- 30 carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia.
12. Un método para preparar el virus oncolítico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la
- 35 etapa de incorporar un ácido nucleico que codifica una enzima alfa 1,3-galactosiltransferasa en el genoma de dicho virus oncolítico.
13. El método según la reivindicación 12, en donde dicha etapa de incorporación comprende la clonación.

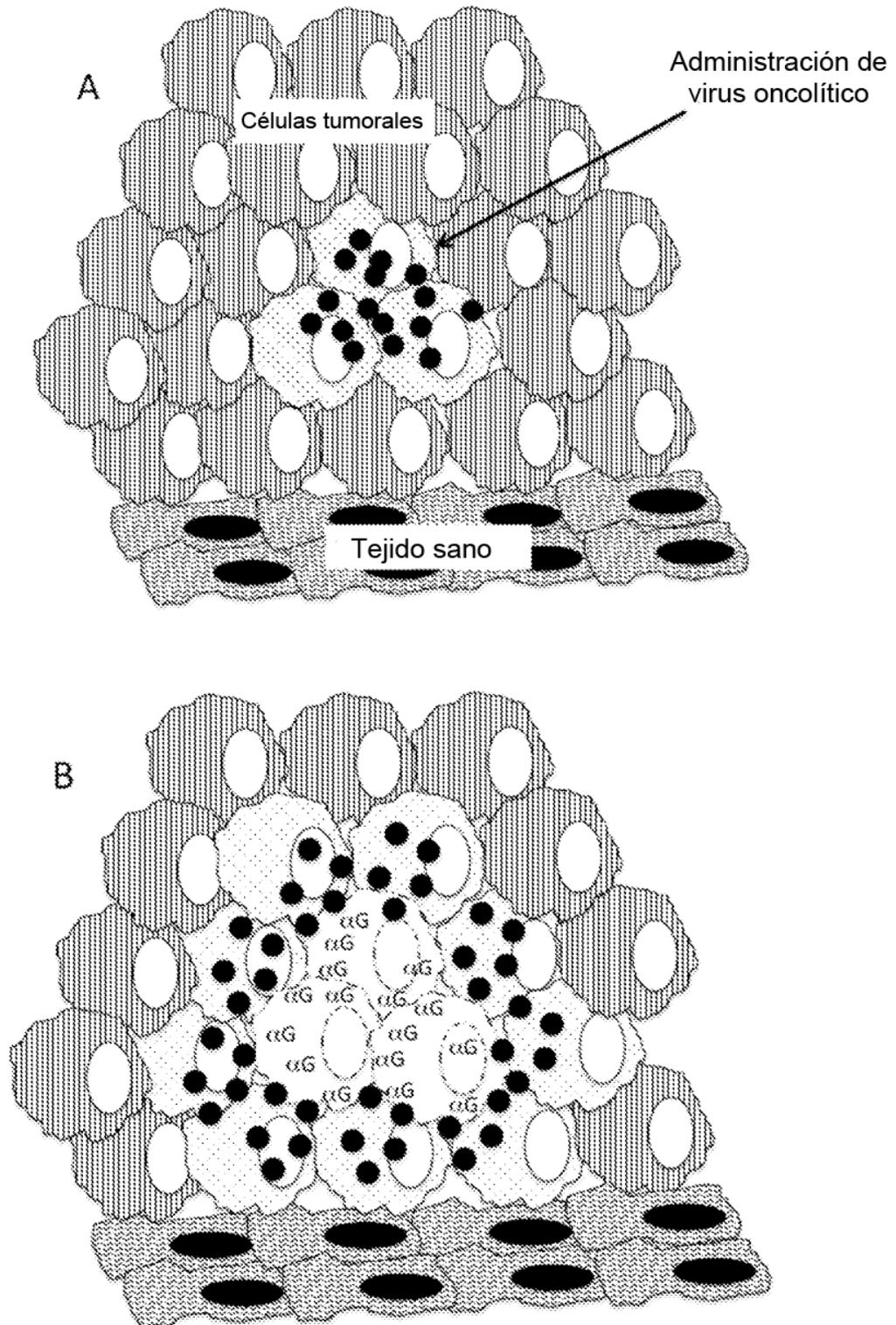


FIGURA 1

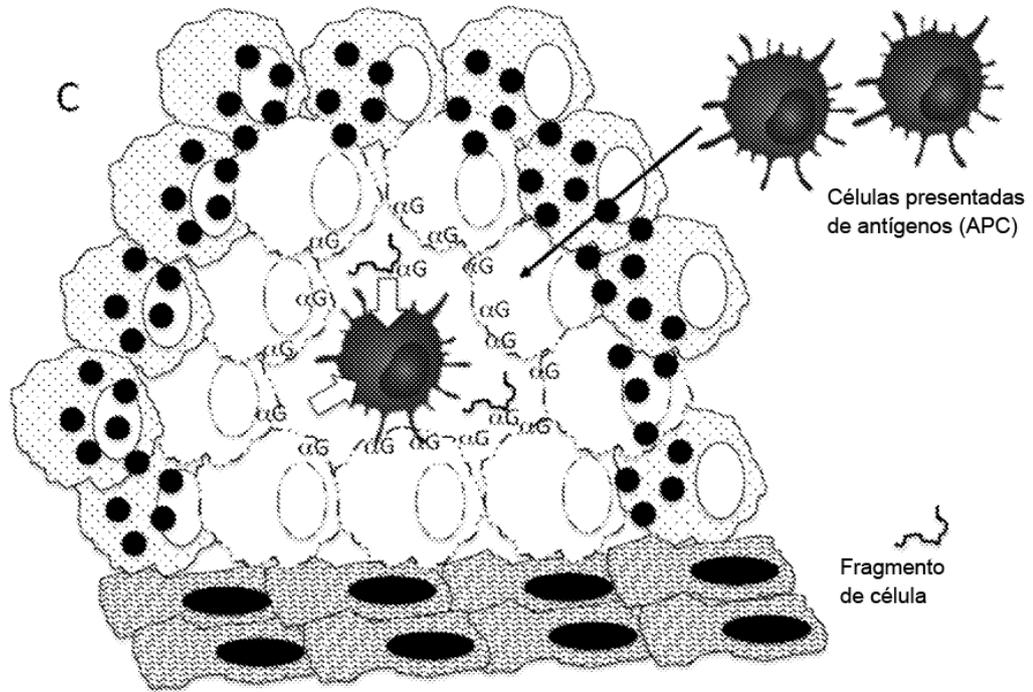


FIGURA 1 (ctd)

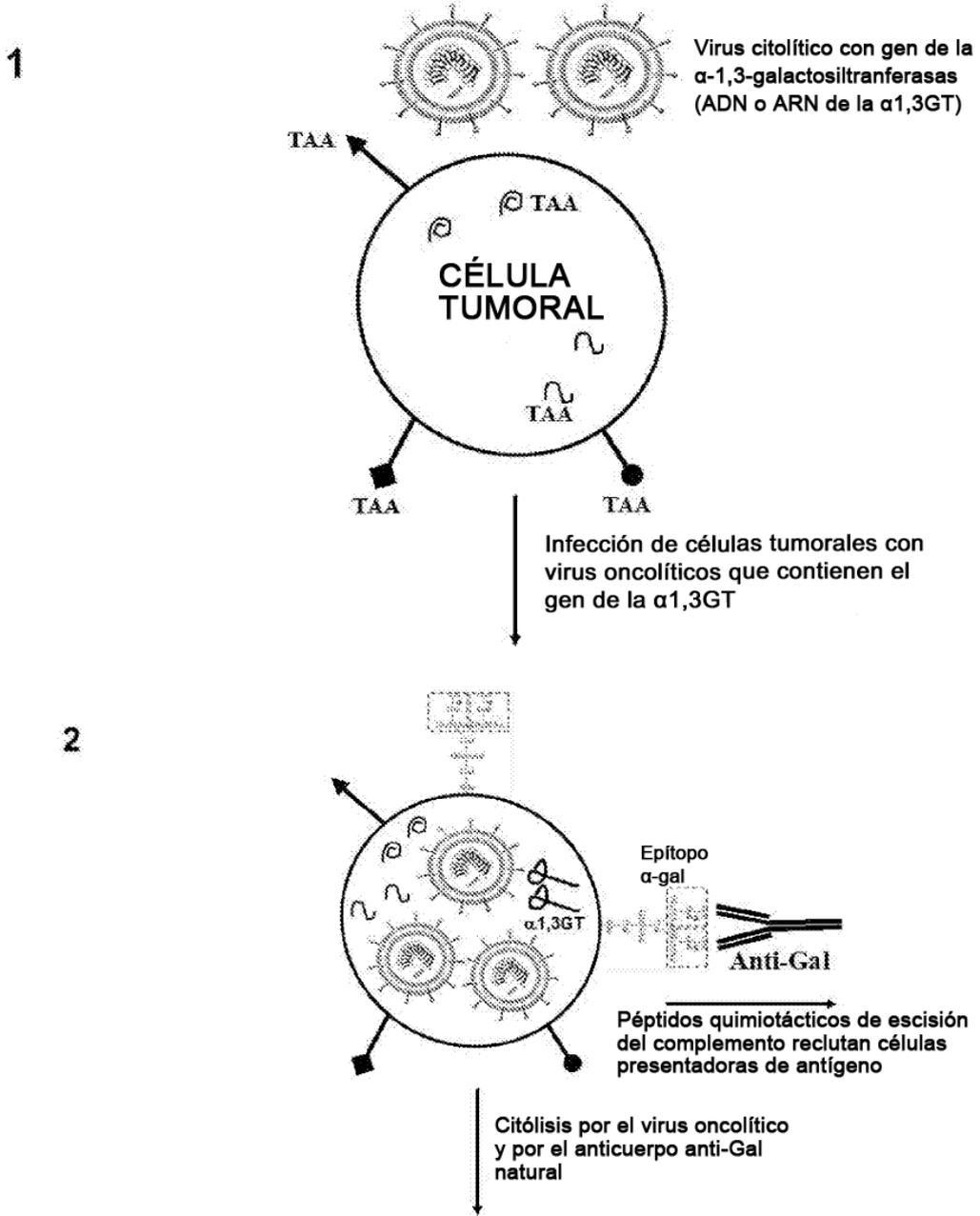


FIGURA 2

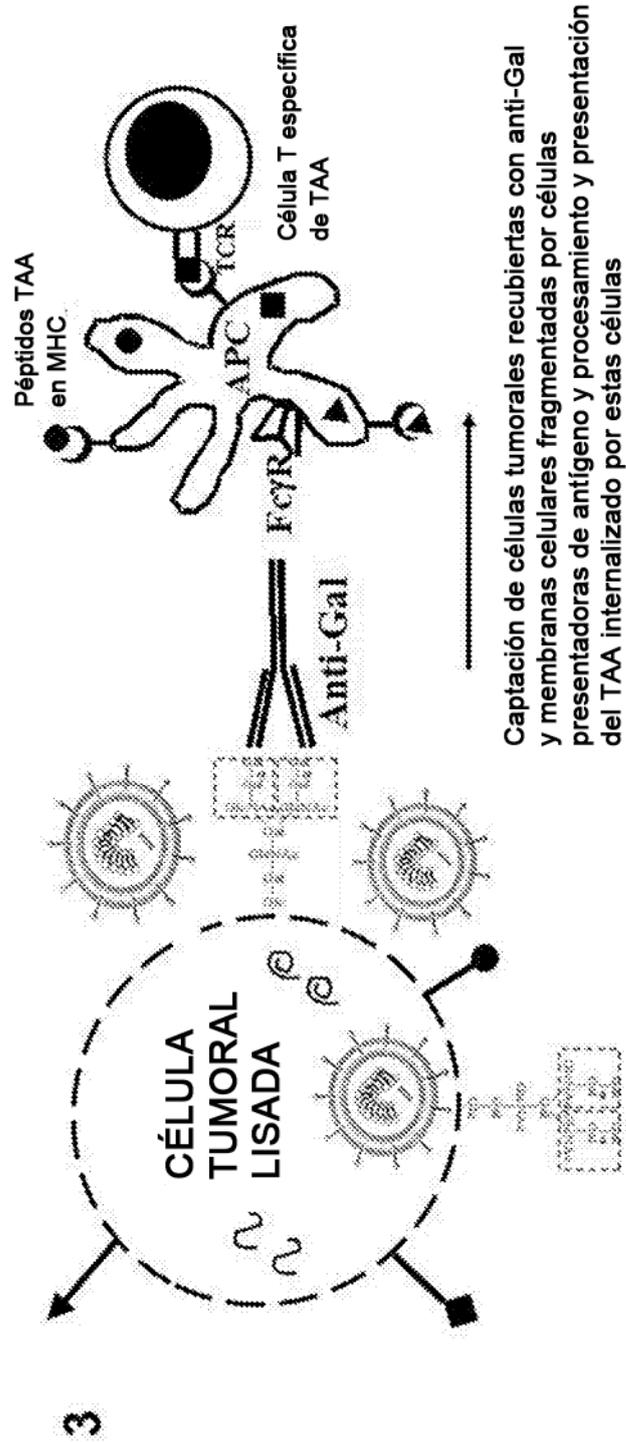


FIGURA 2 (ctd)

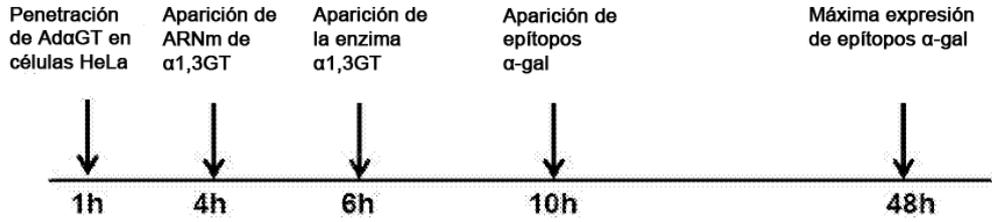


FIGURA 3

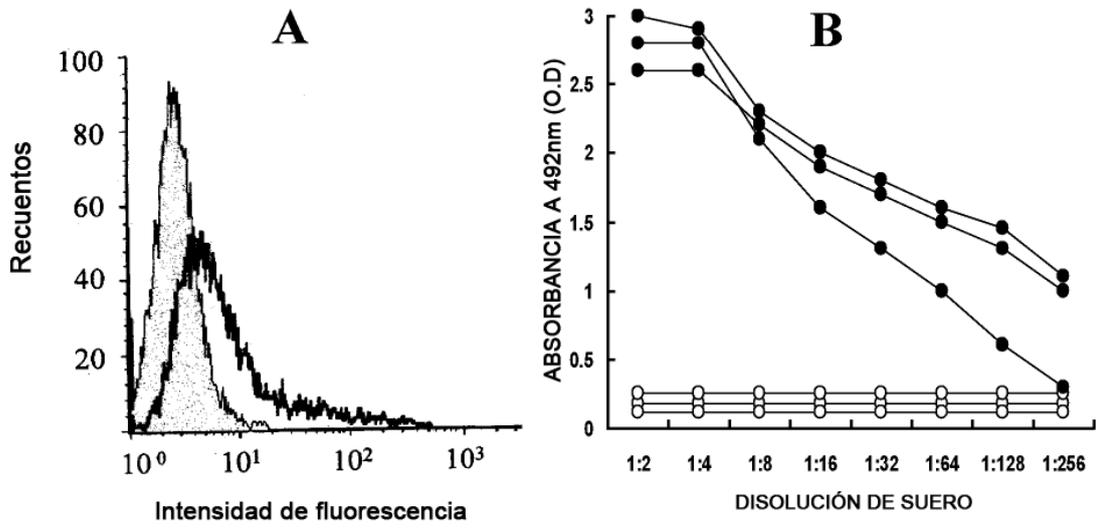


FIGURA 4

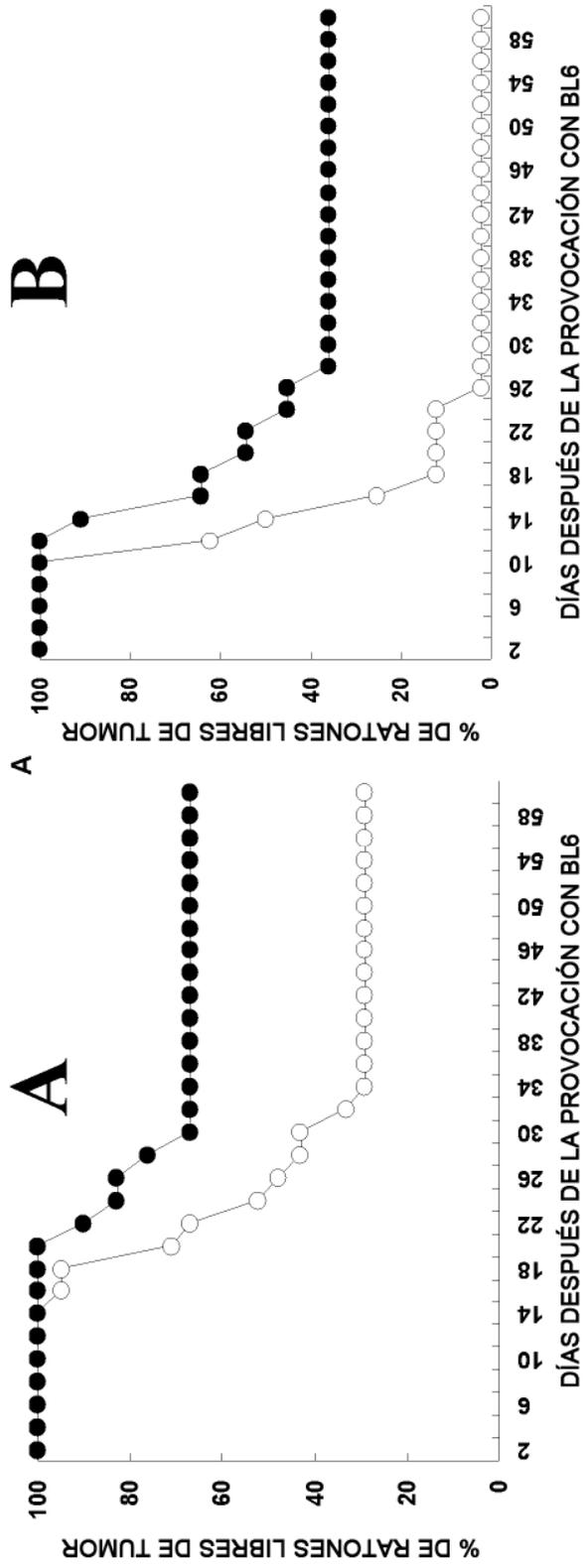


FIGURA 5

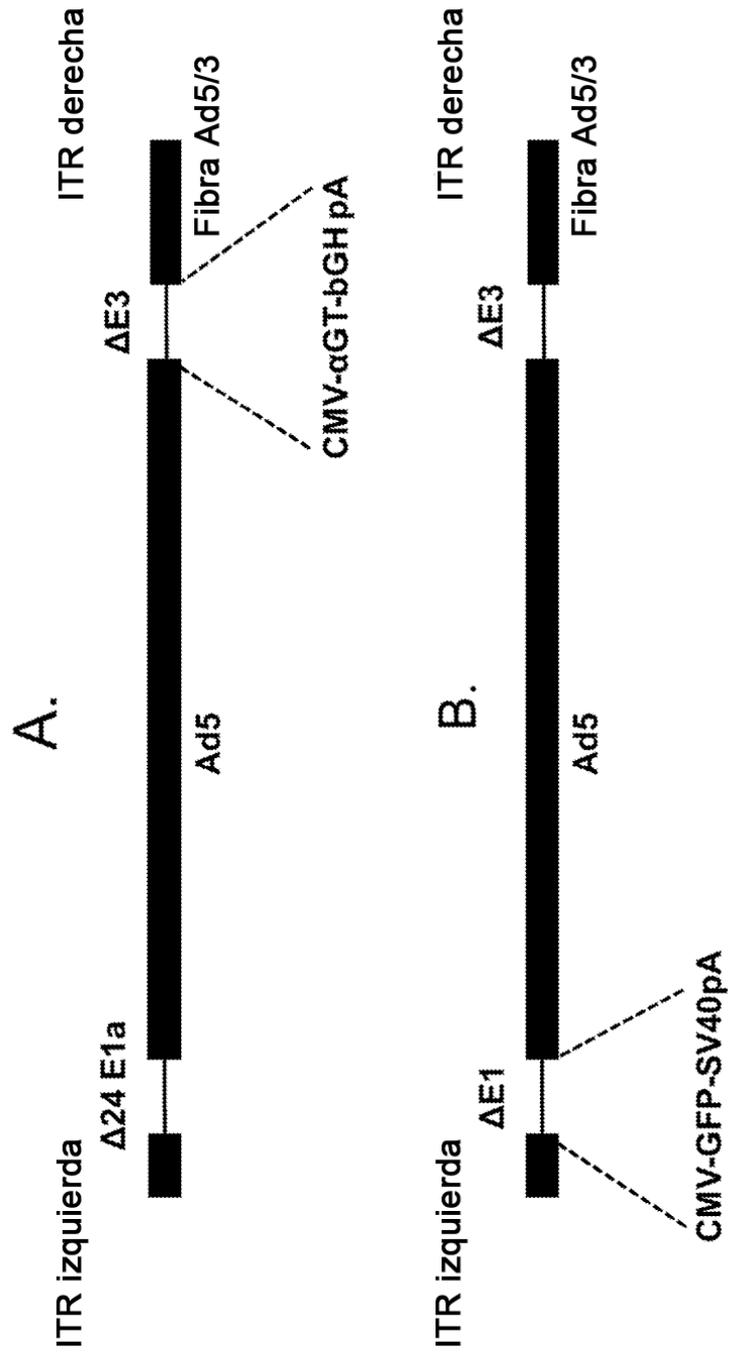


FIGURA 6

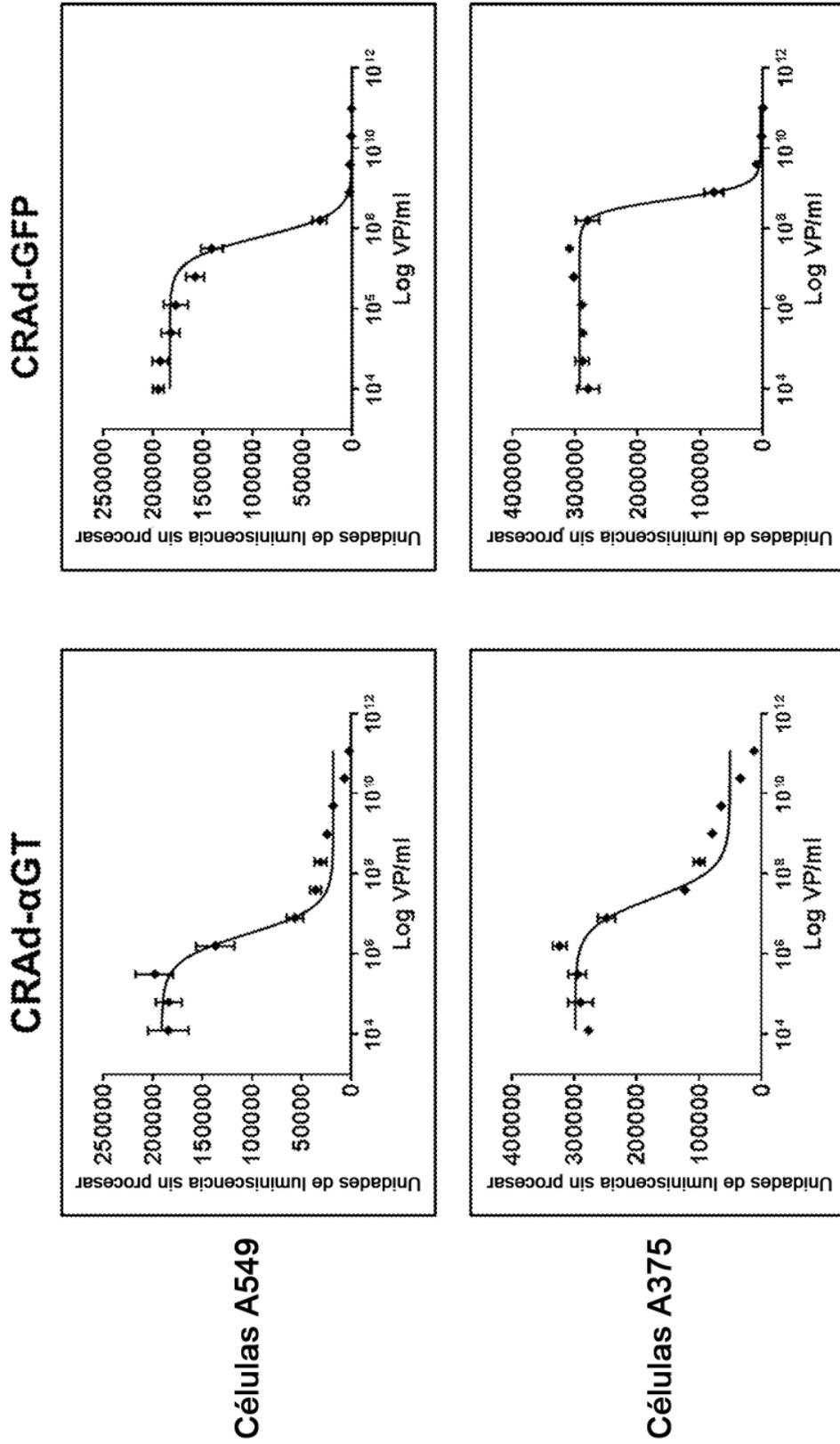


FIGURA 7

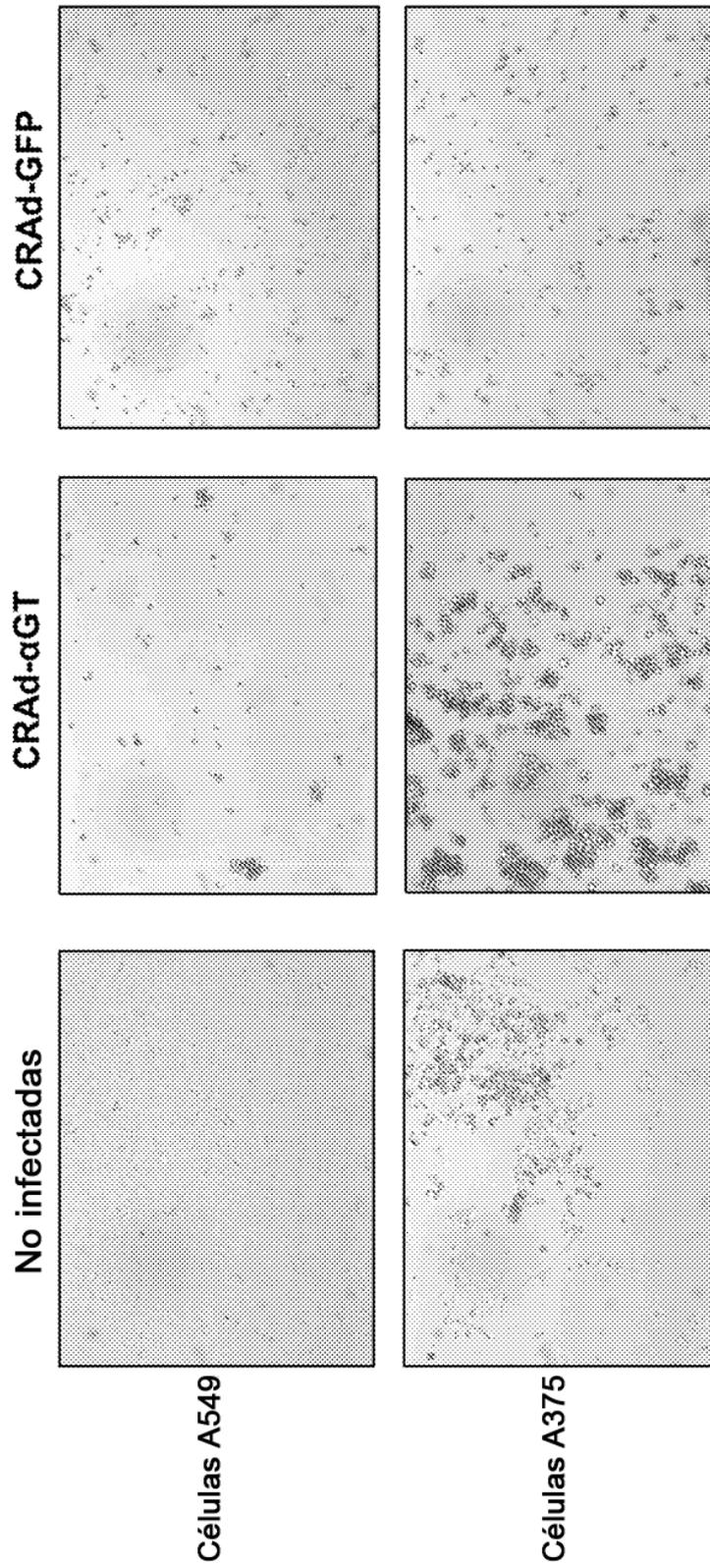


FIGURA 8

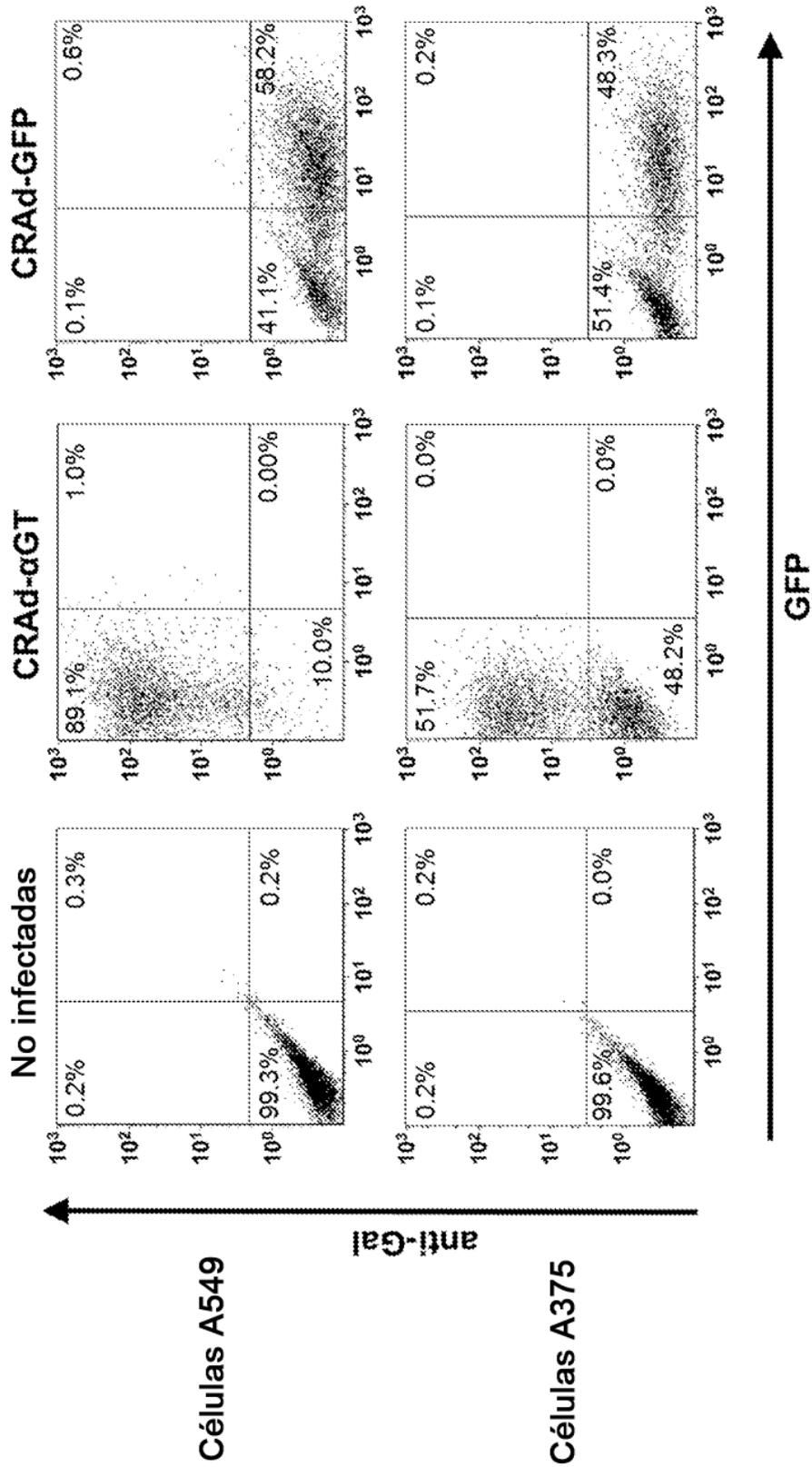


FIGURA 9