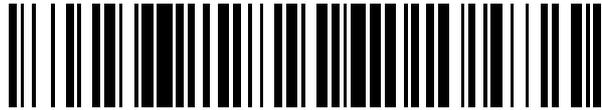


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 479**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2015 PCT/EP2015/057489**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15155174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2015 E 15713906 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3129398**

54 Título: **Agentes medicinales novedosos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

07.04.2014 EP 14163704

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

25.02.2020

73 Titular/es:

**LOKON PHARMA AB (100.0%)
Dag Hammarskjöldsväg 40C
751 83 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:

LOSKOG, ANGELICA

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 744 479 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

Agentes medicinales novedosos y usos de los mismos

5 **Campo de invención**

La presente invención se refiere a un compuesto TMZ-CD154 novedoso y a un método para tratar enfermedades en las que se usa la molécula TMZ-CD154 novedosa. En particular, TMZ-CD154 se usa para modificar las respuestas inmunitarias en pacientes con enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario tales como cáncer y enfermedad infecciosa. La presente invención también se refiere a un método para activar células con TMZ-CD154 *in vitro* o bien antes de usar las células activadas para terapia o bien con fines de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

15 Durante las últimas décadas, la tecnología de transferencia de genes ha estado bajo una extensa investigación en el tratamiento de, por ejemplo, cáncer. En 2012, Glybera se convirtió en el primer tratamiento de terapia génica aprobado para uso clínico. Glybera compensa la deficiencia de lipoproteína lipasa administrando una copia intacta del gen de la lipoproteína lipasa humana (LPL) incorporado en el vector viral del serotipo 1 del virus adenoasociado (AAV1).

20 El objetivo de la terapia génica es introducir un gen funcional/terapéutico en una célula diana tal como una célula tumoral.

25 El documento WO 2012/038607 describe un método para producir CD40L en una célula y aumentar la respuesta inmunitaria específica del tumor y la apoptosis en un sujeto. CD40L (también denominado ligando CD40, CD154 o gp39) es una proteína transmembrana tipo II que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral.

30 El documento WO 02/36769 describe una quimera CD40L-CD40. A diferencia de la secuencia de nucleótidos de la presente invención, la quimera contiene una región de señalización intracelular de otra proteína mientras que la presente invención carece de capacidad de señalización intracelular.

35 Blaser *et al.* (Clin. Immunology 2005, 117, 231-237) y Hsu *et al.* (Journal of Biological Chemistry, 1997, 272, 911-915) describen CD40L que se produce de manera natural, que en el caso de Blaser *et al.* se demuestra que una mutación conduce a una proteína disfuncional. Hsu *et al.* describen que CD40L que se produce de manera natural puede escindirse para liberar el dominio extracelular. Sin embargo, el CD40L liberado no es estable como trímero.

40 Los documentos WO 94/10308 y WO 2007/120368 se refieren a moléculas CD40L multiméricas solubles que no se retienen en la membrana plasmática, sino que se liberan de la célula o se usan como moléculas producidas recombinantes para el uso sistémico en pacientes. Una comparación de estas moléculas solubles con TMZ-CD154 de la presente invención muestra que TMZ-CD154 proporciona una señal de activación más fuerte, probablemente porque se retiene en la membrana plasmática.

45 Morris A E *et al.* (Journal of Biological Chemistry, American Society for Biochemistry and Molecular Biology, vol. 274, n.º 1, 1 de enero, 1999) describen la incorporación de un motivo de cremallera de isoleucina en CD40L soluble.

50 CD154 es una molécula transmembrana que puede trimerizarse tras unirse al receptor CD40. La unión conduce a la estimulación recíproca de las células CD154 positivas y CD40 positivas. CD154 también puede escindirse y secretarse, pero luego actúa como monómero CD154 soluble (sCD154). La unión a membrana o sCD154 activa las células dendríticas (DC) para convertirse en células que presentan antígenos eficientes y activar las denominadas respuestas inmunitarias de tipo Th1 con células efectoras tales como células T y linfocitos citotóxicos naturales (NK). La respuesta inmunitaria de tipo Th1 desempeña un papel crucial en la inmunidad tumoral y es, por tanto, la esencia de la inmunoterapia tumoral activa. CD154 puede inducir apoptosis en células tumorales CD40 positivas mediante medios no completamente establecidos. Sin embargo, algunos informes reivindican que se debe a la activación de caspasa-9 dependiente de la ruta TRAF3-JNK, mientras que otros estudios implican una producción auto o paracrina de ligandos de muerte que pueden inducir la activación de caspasa-8 (Loskog y Eliopoulos, Semin Immunol 2009). CD40 no tiene dominios de muerte en su cola, dando lugar a múltiples explicaciones. La inducción de apoptosis se ha mostrado más potente si CD154 está unido a membrana, lo que puede deberse a la trimerización de este sistema receptor/ligando tras la unión. CD154 se ha usado como molécula soluble en ensayos clínicos que reclutan pacientes con cáncer, pero la exposición sistémica puede dar como resultado enzimas hepáticas aumentadas, lo que no se ha observado cuando CD154 se ha administrado de manera local en una metástasis tumoral, por ejemplo mediante el uso de transferencia génica del serotipo 5 adenoviral (Vonderheide JCO, 2001; Malmström *et al.* CCR 2010). CD154 de longitud completa también se ha usado en virus oncolíticos (Fernandes *et al.* CCR 2009; Gomes *et al.* CCR 2009; Terada *et al.* GT 2006; Diaconu *et al.* CR 2012) y se ha sometido a prueba su seguridad en pacientes (Pesonen *et al.* CR 2012). La molécula CD154 expresada en células T mediante ingeniería genética puede dar como resultado enfermedad linfoproliferativa (Brown *et al.* Nat Med 1998). Por tanto, los vectores que transfieren el gen CD154 de longitud completa y que tienen la capacidad de infectar células que pueden reaccionar de tal manera

pueden provocar toxicidad adversa inesperada.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un derivado de CD154, que mantenga las propiedades beneficiosas con respecto a la apoptosis y la supresión tumoral, pero que no presente una toxicidad adversa no deseada.

5

Breve descripción de la invención

El presente inventor ha desarrollado un derivado de CD154 trimerizado unido a membrana que carece de los dominios de señalización intracelular. El derivado es un inmunomodulador más fuerte que el monómero CD154 correspondiente, no dará lugar a señalización de CD154 interna y no dará lugar a toxicidad sistémica mediada por CD154.

10

Descripción de TMZ-CD154

Esta invención se refiere a una forma de CD154 diseñada por ingeniería genética en la que el dominio extracelular y transmembrana de CD154 se fusiona con un dominio de oligomerización (figura 1). El CD154 diseñado por ingeniería genética retendrá una forma unida a membrana con un dominio extracelular funcional pero no contendrá dominios de señalización intracelular. En cambio, el dominio de oligomerización oligomerizará el CD154 diseñado por ingeniería genética traducido y el complejo de proteína permanecerá unido a membrana.

20

Como ejemplo, se ha producido una molécula CD154 trimerizada que contiene una cremallera de isoleucina unida a membrana denominada TMZ-CD154. TMZ-CD154 forma moléculas oligomerizadas, preferiblemente trimerizadas, de CD154 que carecen del dominio intracelular y se localiza en la membrana celular. TMZ-CD154 expresada en células da como resultado una detección robusta de la molécula en la superficie celular y una secreción mínima de la molécula comparable con CD154 de tipo natural. Las células que expresan TMZ-CD154 activan las células dendríticas (DC) tal como se muestra mediante una expresión uniforme de CD83 y una producción alta de IL12. La producción de IL12 es tan alta como la de CD154 de tipo natural y mayor que si las DC se estimulan con moléculas CD154 multiméricas solubles que demuestran el beneficio de una región transmembrana que retiene TMZ-CD154 en la membrana. Además, la señalización de CD154 en células que expresan CD154 tras el ligamiento de CD40 está escasamente definida pero puede inducir un estado proliferativo en células T que expresan CD154. Por tanto, TMZ-CD154 tendrá las propiedades beneficiosas de estimulación de CD154 de células CD40 positivas sin la activación de las rutas de señalización aguas abajo dentro de las células que expresan TMZ-CD154 que puede provocar un crecimiento descontrolado en, por ejemplo, células T diseñadas por ingeniería genética u otros acontecimientos desconocidos dependientes del tipo de célula diseñada por ingeniería genética. Esto es importante especialmente si la molécula se administra a células que pueden afectarse por una señalización interna de CD154 tal como las células T.

25

30

35

Tal como se describe en el presente documento, la presente invención no se limita a TMZ-CD154, sino que otros nucleótidos/proteínas que tienen los componentes básicos esenciales también están dentro del alcance de la invención. Con fines ilustrativos, se usa TMZ-CD154 como ejemplo de los diversos aspectos de la invención:

40

i) TMZ-CD154 en forma de nucleótido o proteína,

45

ii) TMZ-CD154 para su uso en medicina,

iii) TMZ-CD154 insertado en vehículos genéticos, células, células artificiales o vehículos naturales o artificiales,

50

iv) TMZ-CD154 insertado en vehículos genéticos, células, células artificiales o vehículos naturales o artificiales para su uso en medicina,

v) TMZ-CD154 o TMZ-CD154 insertado en vehículos genéticos, células, células artificiales o vehículos naturales o artificiales para su uso en el tratamiento de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad linfoproliferativa, inflamación, inflamación crónica, autoinmunidad o alergia en medicina humana y/o veterinaria,

55

vi) una composición farmacéutica que comprende TMZ-CD154,

vii) una composición farmacéutica que comprende TMZ-CD154 insertado en vehículos genéticos, células, células artificiales o vehículos naturales o artificiales,

60

viii) un método para producir TMZ-CD154 en una célula.

Descripción de la invención

Basándose en las observaciones informadas en el presente documento, especialmente en vista de los resultados relativos a TMZ-CD154, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica para, desde 5'

65

hasta 3', una proteína transmembrana

OD-(L)-TD-ED

5 en la que

OD es un dominio de oligomerización seleccionado del grupo que consiste en una cremallera de isoleucina y un dominio de trimerización de fibrina T4,

10 L es un ligador, que está presente opcionalmente,

TD es un dominio transmembrana derivado de CD154 o de cualquier proteína transmembrana tipo II, y

15 ED es un dominio extracelular de CD154

con la condición de que la secuencia de nucleótidos no comprenda SEQ ID NO: 16, es decir una secuencia que puede codificar para la región intracelular de CD154, ni la región intracelular de CD40.

20 El dominio transmembrana puede derivarse de CD154 o de cualquier proteína transmembrana tipo II.

El dominio extracelular puede seleccionarse de

i) SEQ ID NO: 11, es decir residuos 199-846 de SEQ ID NO: 1,

25 ii) SEQ ID NO: 11, es decir residuos 199-846 de SEQ ID NO: 1, pero en la que uno o más de los residuos de ácido nucleico 397-420 de SEQ ID NO: 1 se han delecionado o intercambiado con otro ácido nucleico para evitar la escisión de la molécula,

30 iii) SEQ ID NO 12, es decir residuos 127-846 de SEQ ID NO: 3,

iv) SEQ ID NO: 13, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 4,

v) SEQ ID NO: 14, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 5,

35 vi) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 98% o el 99% con una secuencia definida en cualquiera de i)-v), o

vi) un dominio extracelular de CD154 correspondiente de un mamífero.

40 La secuencia de nucleótidos de la presente invención contiene tres elementos obligatorios, que desde el extremo 5' hasta el 3' proporcionan la estructura OD-TD-ED, y al mismo tiempo carece de señalización intracelular. El dominio extracelular de CD40L se fusionará con una región transmembrana para retenerla en la superficie celular para mejorar la señalización y con un dominio de trimerización para la señalización máxima. Un ligador puede insertarse entre OD y TD.

45 La intención de TMZ-CD154 es trimerizar CD40L y retenerlo en la membrana plasmática sin conferir señalización intracelular en la célula portadora de TMZ-CD154 tras la interacción con células CD40+. El fin es transmitir señales, pero no lograr señales recíprocas.

50 CD40L que se produce de manera natural no mantiene una estructura trimerizada *in vivo* de manera sólida, lo que debilita la señalización.

Una secuencia de nucleótidos según la presente invención puede usarse en terapia génica *in vivo*, por ejemplo, y tal como se describe en los ejemplos en el presente documento, mediante la inyección intratumoral de un virus que porta la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, el gen TMZ-CD154) es importante eliminar la región intracelular (por ejemplo, de CD40L). La inyección *in vivo* conducirá a la expresión de la secuencia de nucleótidos en todas las células infectadas incluyendo las células T infiltrantes de tumor, células que pueden expresar de manera natural CD40L, en un tiempo corto durante la activación. La sobreexpresión de CD40L de tipo natural en células T conduce a la proliferación descontrolada de células T y, por tanto, a enfermedades linfoproliferativas en ratones. La eliminación de la región intracelular es importante en cuanto a aspectos de seguridad. TMZ-CD154 no induce la proliferación descontrolada de células T en células T humanas ni tales reacciones adversas que se han observado en ratones tratados con CD40L.

60 En particular, la invención se refiere a CD40L o un derivado de CD154 que tiene la siguiente estructura:

65 OD-(L)-TD-ED, en la que OD es un dominio de oligomerización, L es un ligador, que está presente opcionalmente,

TD el dominio transmembrana y ED es el dominio extracelular. Por tanto, en comparación con CD40L (CD154), la secuencia de nucleótidos de la invención no tiene un dominio intracelular, pero tiene un dominio de oligomerización, que precede a los dominios transmembrana y extracelulares. Por tanto, el dominio intracelular de CD40L (CD154) no está presente.

5

En la tabla a continuación se proporciona un resumen de las secuencias mencionadas en el presente documento.

Lista de secuencias

SEQ ID NO:		
1	TMZ-CD154	Nucleótido
2	TMZ-CD154	Proteína
3	TMZ-CD154 (caballo)	Nucleótido
4	TMZ-CD154 (perro)	Nucleótido
5	TMZ-CD154 (gato)	Nucleótido
6	gen TMZ-CD154/4-1BBL	Nucleótido
7	gen TMZ-CD154/4-1BBL	Proteína
8	gen TMZ-CD154/aIL6R scFv	Nucleótido
9	gen TMZ-CD154/aIL6R scFv	Proteína
10	CD154 de tipo natural longitud completa	Proteína
11	ED – residuos 199-846 de SEQ ID NO: 1	Nucleótido
12	ED – residuos 127-846 de SEQ ID NO: 3	Nucleótido
13	ED – residuos 127-844 de SEQ ID NO: 4	Nucleótido
14	ED – residuos 127-844 de SEQ ID NO: 5	Nucleótido
15	Residuos ID 1-22 de SEQ ID 10	Proteína
16	ID correspondiente a los residuos de aminoácido 1-22 de SEQ ID 10	Nucleótido
17	Residuos TD 127-198 de SEQ ID NO: 1	Nucleótido
18	TD correspondiente a los residuos de ácido nucleico 127-198 de SEQ ID NO: 1	Proteína
19	TD derivado del ligando Ox40 humano	Proteína
20	TD derivado del ligando Ox40 humano	Nucleótido
21	TD derivado de CD70 humano	Proteína
22	TD derivado de CD70 humano	Nucleótido
23	OD – cremallera de isoleucina – residuos 10-108 SEQ ID NO: 1	Nucleótido
24	ED – proteína correspondiente a SEQ ID NO: 11, es decir residuos 199-846 de SEQ ID NO: 1	Proteína
25	Ligador – proteína correspondiente a SQ ID NO: 17, es decir residuos 109-126 de SEQ ID NO: 1	Proteína
26	aa de longitud completa de CD40L humano con cambio en aa para prevenir la escisión de la molécula Q K (n.º 114,115) y D Q N P (n.º 117 – 120) se cambian por P R y E E D S	Proteína
27	TMZ-CD154 (caballo)	Proteína
28	TMZ-CD154 (perro)	Proteína
29	TMZ-CD154 (gato)	Proteína

10

En general, la secuencia de nucleótidos es CD154 que carece de la región intracelular y tal como parece de lo anterior, CD154 puede derivarse de mamíferos incluyendo ser humano, caballo, perro, gato, etc. Se prefiere CD154 humano. Se prevé que uno o más de los residuos de CD154 pueden delecionarse o sustituirse. En la siguiente tabla

e ilustrada con CD154 humano (proporcionado como proteína) se proporciona una indicación de qué residuos pueden sustituirse con otro residuo. Cualquier combinación de patrón de sustitución/delección está dentro del alcance de la presente solicitud. Por tanto, uno o más de los aminoácidos de CD154 (que carecen de la región intracelular) indicados en la tabla a continuación pueden sustituirse/delecionarse según el cambio específico establecido.

5 Algunos de los aminoácidos de CD154 (proteína) también pueden sustituirse para prevenir la escisión de la molécula. SEQ ID NO: 26 proporciona un ejemplo de una secuencia de este tipo, en la que los cambios son tal como sigue (basándose en CD150 humano de longitud completa): Q114P, K115R, D117E, Q118E, N119D y P120S. Una
10 secuencia de nucleótidos correspondiente a la proteína de SEQ ID NO: 26, pero que carece de la región intracelular también está dentro del alcance de la presente invención.

Variaciones naturales en la secuencia de aminoácidos de CD154 humano

Referencia: UniProtKB/Swiss-Prot/P29965 (CD40L_HUMAN)

15

Posición (aa)	Cambio	Dominio
36	M por R	TD
38	G por R	TD
116	G por R	ED
116	G por S	ED
123	A por E	ED
125	H por R	ED
126	V por A	ED
126	V por D	ED
128-129	SE por RG	ED
140	W por C	ED
140	W por G	ED
140	W por R	ED
143	K por T	ED
144	G por E	ED
147	T por N	ED
155	L por P	ED
170	Y por C	ED
173	A por D	ED
174	Q por R	ED
176	T por I	ED
195	L por P	ED
208	A por D	ED
211	T por N	ED
219	G por R	ED
224	H por Y	ED
226	G por A	ED
227	G por V	ED
227	Desaparecido	ED
231	L por S	ED
235	A por P	ED
237	V por E	ED
254	T por M	ED
257	G por D	ED
257	G por S	ED
258	L por S	ED

Tal como se mencionó anteriormente, el dominio transmembrana puede ser cualquier proteína transmembrana, en particular derivada de CD154, ligando OX40 humano o CD70 humano.

20 Por tanto, el dominio transmembrana puede tener una identidad de secuencia de al menos el 90% con

i) SEQ ID NO: 17, es decir residuos 127-198 de SEQ ID NO 1,

25

ii) SEQ ID NO: 20, es decir dominio transmembrana de OX40 humano, o

iii) SEQ ID NO: 22, es decir dominio transmembrana de CD70 humano,

o puede tener una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con SEQ

ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22.

Como ejemplo, el dominio transmembrana tiene SEQ ID NO: 17, es decir los residuos 127-198 de SEQ ID NO: 1 (TMZ-CD154).

El dominio de oligomerización es una cremallera de isoleucina o un dominio de trimerización de fibritina T4. Como ejemplo, el dominio de oligomerización es la cremallera de isoleucina que tiene SEQ ID NO: 23, es decir residuos 10-108 de SEQ ID NO: 1.

La secuencia de nucleótidos puede comprender además una secuencia de Kozak, por ejemplo correspondiente a los residuos 1-9 de SEQ ID NO: 1.

La secuencia de Kozak es una secuencia corta de nucleótidos que se produce en ARNm eucariota para potenciar el inicio del proceso de traducción. Para potenciar la traducción de TMZ-CD154 cuando se usa en ámbitos de terapia génica, la secuencia génica de TMZ-CD154 se sigue mediante una secuencia de Kozak. La secuencia de Kozak estará presente si TMZ-CD154 se expresa solo o como el primer gen en un transcrito que contiene genes adicionales para inmunomoduladores u otras moléculas. Por tanto, en el presente contexto, un nucleótido según la presente invención puede tener o no una secuencia de Kozak. Ambas formas están dentro del alcance de la presente invención.

A modo de ejemplo, una secuencia de nucleótidos según la invención puede tener una identidad de secuencia de al menos el 90% o al menos el 95% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. Específicamente, una secuencia de nucleótidos según la invención puede tener una identidad de secuencia de al menos el 98% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, o ser idéntica a los nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

Una secuencia de nucleótidos según la invención también puede combinarse con un inmunomodulador. Los ejemplos de inmunomoduladores adecuados son el gen del ligando de 4-1BB, o un gen para un scFv anti-IL6R.

De manera análoga, una secuencia de nucleótidos según la invención puede combinarse con un modulador de la ruta de señalización tal como un scFv anti-IL6R; o puede combinarse con un bloqueante de la ruta de señalización. Por tanto, una secuencia de nucleótidos según la invención puede tener una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 98% o el 100% con SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 (gen TMZ-CD154/4-1BBL y gen TMZ-CD154/all6R scFv, respectivamente).

El uso de una secuencia de nucleótidos según la invención se describe en detalle en el presente documento. En general, la secuencia de nucleótidos puede usarse en medicina y/o como herramienta de diagnóstico.

La invención también se refiere a una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos tal como se define en el presente documento.

En analogía con la definición de una secuencia de nucleótidos según la invención, una proteína de la invención puede definirse como una proteína que comprende la estructura

OD-(L)-TD-ED,

en la que OD es una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio de oligomerización,

L es un ligador, que está presente opcionalmente,

TD es una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio transmembrana, y

ED es una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio extracelular de CD154,

con la condición de que la proteína no comprenda una secuencia de aminoácidos correspondiente a la región intracelular de CD154 correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, ni la región intracelular de CD40.

El dominio extracelular de CD154 puede seleccionarse de

i) SEQ ID NO: 24,

ii) SEQ ID NO: 24, pero en la que uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos MQKGDQNP correspondiente a los residuos de nucleótido 397-420 de SEQ ID NO: 1 se han delecionado o intercambiado con otro aminoácido para evitar la escisión de la molécula,

iii) residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de nucleótido de SEQ ID NO 12, es decir residuos 127-846 de SEQ ID NO: 3,

iv) residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de nucleótido de SEQ ID NO: 13, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 4,

v) residuos de aminoácido correspondientes a los residuos de nucleótido de SEQ ID NO: 14, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 5,

vi) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 98% o el 99% con una secuencia definida en cualquiera de i)-v), o

vi) un dominio extracelular de CD154 correspondiente de un mamífero.

El dominio transmembrana puede derivarse de CD154 o cualquier proteína transmembrana tipo II. Puede tener una identidad de secuencias de al menos el 90%, el 95%, el 98% o el 100% con SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, preferiblemente con SEQ ID NO: 18.

La proteína según la invención carece de una región intracelular tal como la región intracelular de CD154 o CD40.

Los detalles y pormenores descritos en el aspecto de nucleótidos también se aplican para los aspectos de la proteína, sin embargo, respecto al aspecto de la proteína, las partes relevantes de las moléculas son las secuencias de aminoácidos correspondientes a los nucleótidos descritos o secuencias de aminoácidos codificadas por los nucleótidos descritos en el presente documento.

A modo de ejemplo, una proteína según la invención puede comprender un ED que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% o al menos el 95% para SEQ ID NO: 24. Además, en la tabla anterior se proporciona una revisión de posibles cambios en el ED. Tal como se describió anteriormente, cualquier cambio y combinación de cambios de este tipo pretenden estar dentro del alcance de la presente invención.

Más específicamente, el dominio de oligomerización es un dominio de cremallera de isoleucina o un dominio de trimerización de fibritina T4. Tal como se mencionó anteriormente, el dominio transmembrana puede derivarse del dominio transmembrana de CD154 o de cualquier proteína transmembrana tipo II. Específicamente, la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio transmembrana tiene al menos una identidad de secuencia del 90%, el 95%, el 98% o el 100% para SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 (TD derivado del ligando OX40) o SEQ ID NO: 21 (TD derivado de CD70). Como ejemplo, el dominio transmembrana de una proteína según la invención puede ser SEQ ID NO: 18 o una proteína, en la que uno o más de los residuos de SEQ ID NO: 18 pueden deletionarse o sustituirse con otro aminoácido. Ejemplos de tales residuos son aa14 y/o aa16, en los que, por ejemplo, M14R y/o G15R (correspondientes a M36R y G38R en CD154 de longitud completa). En particular, una proteína según la invención puede tener una identidad de secuencia de al menos el 90%, el 95% o el 98% con SEQ ID NO: 2, tal como una identidad de secuencia del 100% con SEQ ID NO: 2.

El uso de una proteína según la invención se describe en detalle en el presente documento. De manera general, una proteína puede usarse en medicina y/o como herramienta de diagnóstico. TMZ-CD154 es especialmente de interés en forma tanto de nucleótido como de proteína.

Detalles respecto a la referencia de TMZ-CD154 para estructura y secuencias

El gen TMZ-CD154 contiene los dominios extracelulares y transmembrana de CD154 fusionados con un dominio de oligomerización pero que carecen de la región intracelular de CD154. Más específicamente, el gen TMZ-CD154 tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con una de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En particular, el gen TMZ-CD154 tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con una de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En particular, el gen TMZ-CD154 es uno de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO.2 corresponde a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Se abarca también por la presente invención la proteína de TMZ-CD154 que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la secuencia de proteína correspondiente de una de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En particular, la proteína de TMZ-CD154 tiene una identidad de secuencia de al menos el 95% con la secuencia de proteína correspondiente de una de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En particular, la proteína de TMZ-CD154 corresponde a la secuencia de proteína correspondiente de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5. En particular, la proteína tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% o al menos el 95% con la SEQ ID NO: 2. En particular, la proteína de TMZ-CD154 tiene la de secuencia proteína de SEQ ID NO: 2.

Los dominios de TMZ-CD154 pueden ser de origen humano, pero también pueden ser originarios de otras especies

que incluyen, pero no se limitan a, perro, gato y caballo. El transgén puede usarse en forma autóloga, alogénica o xenogénica. Por ejemplo, TMZ-CD154 humano puede usarse para tratar enfermedades en seres humanos, gato, perro y/o caballo.

5 El dominio de oligomerización es un dominio de cremallera de isoleucina o el dominio de trimerización de fibritina T4.

10 El dominio transmembrana puede derivarse de la molécula CD154 o de otras moléculas que muestren una o más regiones transmembrana, o una región diseñada para potenciar la retención de CD154 en la membrana. Las regiones transmembrana pueden ser hélices alfa transmembrana únicas o múltiples, barril(es) beta, una hélice beta de gramicidina A, pero también pueden ser otras estructuras.

Vehículos

15 La invención también se refiere a un vehículo que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se define en el presente documento. El vehículo puede ser cualquier vehículo adecuado incluyendo plásmidos, vectores virales, transposones, células, células artificiales y vehículos artificiales.

20 Cuando TMZ-CD154 se usa a continuación, abarca TMZ-CD154 como tal así como los otros nucleótidos (y proteínas, si procede) según la presente invención.

El vehículo para la transferencia de TMZ-CD154 puede ser, pero no se limita a, un plásmido, un vector viral deficiente en replicación, un virus competente en replicación, un transposón, una célula, una célula artificial o un vehículo artificial.

25 TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento puede administrarse en los vehículos descritos en el presente documento como un ADN, ADNc, ARN, ARNm, oligonucleótido o una proteína.

Plásmidos

30 El vehículo para la transferencia de secuencias de nucleótidos según la presente invención, en particular de TMZ-CD154, puede ser un plásmido, un derivado de plásmido minicircular o un plásmido o minicirculo de autorreplicación.

35 El vector de plásmido puede ser, pero no se limita a, un plásmido básico que consiste en una secuencia de ADN circular con sitios de ORI, enzima(s) de restricción, promotor(es) y secuencia de nucleótidos según la invención, en particular la secuencia TMZ-CD154, con codones de inicio y de terminación.

40 El plásmido también puede ser un denominado derivado de plásmido minicircular sin partes de vector procarionta o limitadas pero que contiene la secuencia de nucleótidos según la presente invención, en particular la secuencia TMZ-CD154.

45 El plásmido que contiene el nucleótido según la invención, en particular la secuencia TMZ-CD154, puede ser un denominado plásmido o minicirculo de autorreplicación que contiene un elemento S/MAR u otra parte que permite la autorreplicación del plásmido o minicirculo en células.

Vectores virales

50 El vector puede ser un vector viral deficiente en replicación o un virus competente en replicación que contiene la secuencia de nucleótidos según la invención, por ejemplo TMZ-CD154.

55 Vector viral deficiente significa un virus que no puede replicarse por sus propios medios debido a la delección de genes implicados en la replicación viral. Por ejemplo, el gen 1 de expresión temprana (E1) puede deleccionarse de la familia de virus *Adenoviridae* para generar un vector viral de replicación deficiente. Para fomentar el crecimiento de un virus de replicación, los genes desaparecidos/proteínas relacionadas necesitan proporcionarse por, pero no se limitan a, un inserto de gen E1 en la línea celular productora (tal como las líneas celulares productoras 293, 293T, 911, C6 (Crucell)). Los genes desaparecidos/proteínas relacionadas también pueden proporcionarse de manera separada a una línea celular que produce virus. Por ejemplo, el plásmido de un vector deficiente en replicación originario de *Retroviridae* puede transfectarse junto con genes/proteínas que contienen los genes desaparecidos en células productoras.

60 Virus competente en replicación significa un virus que puede replicarse por sus propios medios en cualquier célula que infecte o en células de un origen específico. Las últimas pueden ser un virus replicativo de manera condicional en el que la replicación está impulsada por un promotor que sólo es activo en determinadas células o en determinadas circunstancias. Tal célula puede ser una célula tumoral o una célula específica del órgano y tal circunstancia puede ser una actividad de promotor regulada por incremento debido a la proliferación tal como el promotor de la telomerasa (TERT) o una ruta interrumpida de retinoblastoma Rb.

5 El vector viral deficiente en replicación o el virus competente en replicación, tal como se establece anteriormente, puede tener otras deleciones en el genoma del virus para dar más espacio para transgenes tales como TMZ-CD154 o para eliminar segmentos génicos que de otra forma comprometen el efecto del tratamiento o la expresión del transgén. Por ejemplo, el gen 3 de expresión temprana (E3) puede deletarse de manera parcial o completa de la familia de virus *Adenoviridae* por las razones anteriormente mencionadas.

10 El vector viral deficiente en replicación o el virus competente en replicación, tal como se establece anteriormente, puede tener adiciones de promotores para impulsar la replicación o la expresión del transgén, y aislantes o similares para proteger el promotor o transgén de acciones de inhibición, para potenciar la traducción del transgén, o para aumentar o potenciar la especificidad de la función oncolítica de un virus oncolítico. Por ejemplo, los vectores virales pueden contener promotores derivados de, pero no limitados a, citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (VSR), virus de células madre murinas (VCMM) y/o promotor del factor-1a de elongación humano (EF-1a).

15 El vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describió anteriormente, pueden ser, pero no se limitan a, un miembro de las familias virales *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Parvoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Hepadnaviridae*, *Anelloviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Togaviridae*, *Arenaviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Coronaviridae*, *Astroviridae*, *Bornaviridae*, *Arteriviridae*, *Hepeviridae*.

20 El vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describió anteriormente, pueden ser, pero no se limitan a, un miembro de los virus de ADN tales como *Adenoviridae*, *Papovaviridae*, *Parvoviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*, *Hepadnaviridae*, *Anelloviridae*.

25 El vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describió anteriormente pueden ser, pero no se limitan a, un miembro de los virus de ARN tales como *Retroviridae*, *Reoviridae*, *Picornaviridae*, *Caliciviridae*, *Togaviridae*, *Arenaviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Filoviridae*, *Coronaviridae*, *Astroviridae*, *Bornaviridae*, *Arteriviridae*, *Hepeviridae*.

30 El vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describió anteriormente pueden ser un miembro de *Adenoviridae*, *Parvoviridae*, *Poxviridae*, *Retroviridae*, *Togaviridae*.

35 Tal como se ejemplifica en los ejemplos en el presente documento, un vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describe en el presente documento es un miembro de la familia *Adenoviridae*.

40 El vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describe en el presente documento pueden ser un virus quimérico. Virus quimérico significa un virus tal como se describió anteriormente compuesto por a) dos o más partes virales diferentes dentro de una familia viral descrita en el presente documento, b) dos o más partes virales diferentes de diferentes virus, o c) una mezcla de "a" y "b" o d) un vector viral que puede tener genes de otras especies. Por ejemplo, un promotor derivado de virus CMV puede insertarse en un vector viral de otra familia de virus, o un vector viral puede mostrar promotores o genes humanos.

45 El vector viral deficiente en replicación o los virus competentes en replicación tal como se describe en el presente documento puede ser un virus quimérico tal como se describió anteriormente, especialmente un virus quimérico que consiste en el esqueleto del serotipo 5 de adenovirus en el que el eje y la perilla de la fibra se derivan de adenovirus de serotipo 35.

50 Por tanto, un vehículo según la invención puede ser un virus, que es un virus de serotipo 5/35 adenoviral. El virus de 5/35 adenoviral puede tener una región/sitios de unión de de promotor E2F en el sentido de 5 del gen E1A, puede contener un sitio Sp-1 en el sentido de 5' del gen E1A, una deleción E1A Δ 24, E3 Δ 6.7K/gp19K, y el casete transgénico que incluye el pCMV y el/los transgén/transgenes se inserta(n) después de la región génica L5.

55 *Transposones*

El vehículo genético también puede ser un transposón. Transposón significa un vector derivado de un elemento transponible (TE, transposón o retrotransposón). Por ejemplo, pero no limitado a, el sistema de transposón Sleeping Beauty o el sistema de transposón PiggyBac.

60 *Células, células artificiales o vehículos artificiales*

65 La secuencia de nucleótidos que incluye TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento puede insertarse y mostrarse en células, células artificiales o vehículos artificiales. Estas células/vehículos pueden usarse como vehículos de administración simples de la secuencia de nucleótidos o de la proteína traducida, por ejemplo TMZ-CD154, a un sitio de enfermedad tal como un tumor. Si las células se afectan directamente por las secuencias de nucleótidos/proteína traducida, por ejemplo TMZ-CD154, el vehículo celular puede usarse tanto como administración

de la secuencia de nucleótidos/proteína traducida, por ejemplo TMZ-CD154, y como una terapia celular debido a las propiedades novedosas que muestra la célula debido a la secuencia de nucleótidos/proteína traducida, por ejemplo TMZ-CD154.

5 Las células diseñadas por ingeniería genética de TMZ-CD154 pueden ser, pero no se limitan a ser, células tumorales (por ejemplo, vacunas de células tumorales), células del sistema inmunitario tales como células T, células dendríticas, monocitos y macrófagos, y otros tipos de células tales como fibroblastos, células del estroma mesenquimatoso, células endoteliales, células epiteliales.

10 Las células diseñadas por ingeniería genética de TMZ-CD154 pueden ser células tumorales que son autólogas o alogénicas al paciente. Tales células diseñadas por ingeniería genética pueden usarse como vacuna celular en pacientes con cáncer.

15 Las células diseñadas por ingeniería genética de TMZ-CD154 son células autólogas o alogénicas originarias del sistema inmunitario tal como se describe en el presente documento que van a usarse para tratar pacientes. Por ejemplo, las células pueden ser de origen linfoide tales como linfocitos citolíticos naturales o células T que seleccionan como diana antígenos generadas por o bien seleccionando y expandiendo células T que reconocen antígenos que se producen de manera natural o bien células T diseñadas por ingeniería genética (por ejemplo, células T que expresan receptores de antígenos quiméricos, receptores de células T que seleccionan como diana antígenos o equivalentes).

20 “Antígeno” significa una diana que va a reconocerse por las células T a través del receptor de células T, el receptor de antígenos quiméricos o equivalentes, tales como, pero no limitados a, un antígeno específico de tumor o asociado para tratar cáncer o un antígeno microbiano para tratar enfermedad infecciosa o células cancerosas que también presentan antígeno microbiano. Por ejemplo, el virus de Epstein-Barr (VEB) puede expresarse en cánceres de origen de células B y por tanto, pueden usarse antígenos de VEB como una diana de células cancerosas. De la misma manera, el virus del papiloma y CMV se han asociado con el cáncer.

25 Las células diseñadas por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo TMZ-CD154, también pueden ser de origen mielóide, tales como, pero no limitadas a, monocitos, células dendríticas y macrófagos. Estas células pueden seleccionarse de células que se producen de manera natural, células generadas a partir de progenitores *ex vivo* y/o células génicas diseñadas por ingeniería genética para lograr propiedades potenciadas o novedosas. Por ejemplo, las células pueden cultivarse con citocinas u otros estimuladores tales como otras células, antígenos, proteínas, anticuerpos, péptidos, nucleótidos, ARN, ADN, etc., o diseñarse por ingeniería genética con vehículos génicos para lograr propiedades novedosas.

30 Las células diseñadas por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo TMZ-CD154, también pueden ser células autólogas o alogénicas distintas a células tumorales y células inmunitarias tales como, pero no limitadas a, células madre, fibroblastos, células del estroma mesenquimatoso, células endoteliales y células epiteliales. Las células pueden ser células que se producen de manera natural o generadas cultivando los progenitores. Las células pueden haberse cultivado *ex vivo* y/o estimulado con citocinas u otros estimuladores tales como otras células, antígenos, proteínas, anticuerpos, péptidos, nucleótidos, ARN, ADN, etc., o diseñado por ingeniería genética con vehículos génicos para lograr propiedades novedosas.

35 La secuencia de nucleótidos según la invención, por ejemplo TMZ-CD154, puede mostrarse o administrarse mediante células artificiales. Células artificiales significa una entidad que puede tener algunas características biológicas importantes de una determinada función celular. Puede ser una vesícula encerrada en una membrana lipídica, una membrana plasmática o una membrana artificial que 1) contiene TMZ-CD154 tal como se describe en el presente documento que va a transportarse y liberarse en un sitio de enfermedad tal como un tumor, 2) porta la secuencia de nucleótidos de la invención, por ejemplo TMZ-CD154, en la membrana para activar células CD40 positivas en un sitio de enfermedad o *in vitro*.

40 La secuencia de nucleótidos según la invención, por ejemplo TMZ-CD154, también puede mostrarse o administrarse mediante vehículos naturales o artificiales. Vehículos naturales o artificiales significa diferentes composiciones de liposomas, perlas, nanopartículas o vesículas, por ejemplo cargadas con TMZ-CD154 en la superficie o en un núcleo interno para la rápida o lenta liberación de por ejemplo TMZ-CD154. Las vesículas pueden ser, por ejemplo, exosomas purificados de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo TMZ-CD154, que expresan células.

45 *Uso de vehículos genéticos que comprenden una secuencia de nucleótidos según la invención, por ejemplo TMZ-CD154*

50 Pueden usarse vehículos genéticos, células, células artificiales, vehículos naturales o artificiales diseñados por ingeniería genética con una secuencia de nucleótidos según la invención, por ejemplo TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, para la estimulación *in vitro* de células que se usan luego como terapia celular o como estimuladores para células que se usarán después para terapia celular. Por ejemplo, pueden usarse células dendríticas diseñadas por ingeniería genética de TMZ-CD154 pulsadas con péptidos tumorales o virales como una

terapia celular para cáncer o enfermedad infecciosa.

5 Pueden usarse vehículos genéticos, células, células artificiales, vehículos artificiales diseñados por ingeniería genética con una secuencia de nucleótidos, por ejemplo TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, para la estimulación *in vitro* de células que se usan luego para terapia celular. Por ejemplo, pueden usarse células dendríticas diseñadas por ingeniería genética de TMZ-CD154 para la estimulación *in vitro* y la expansión de células T que seleccionan como diana un tumor, o virus, antes de la terapia de células T de cáncer o enfermedad infecciosa.

10 Además, se usan vehículos genéticos, células, células artificiales, vehículos artificiales diseñados por ingeniería genética con una secuencia de nucleótidos, por ejemplo TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, para la estimulación *in vitro* de células que se usan para análisis *in vitro* de pacientes de individuos sanos. Por ejemplo, pueden usarse células dendríticas diseñadas por ingeniería genética de TMZ-CD154 para la expansión *in vitro* de células T específicas de tumor o virus para evaluar la presencia y función de tales poblaciones celulares en sangre o biopsias.

15 TMZ-CD154 y las otras secuencias tal como se define en el presente documento pueden usarse como agente terapéutico en forma de ADN, ADNc, ARN, ARNm, oligonucleótido o proteína. A continuación, los usos se ejemplifican con TMZ-CD154 como ejemplo, pero los otros nucleótidos y proteínas según la presente invención también pueden emplearse para los usos descritos.

20 *TMZ-CD154 para su uso en medicina*

TMZ-CD154 puede usarse en medicina. Especialmente, TMZ-CD154 puede usarse en el tratamiento de cánceres.

25 TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento puede usarse para tratar cáncer tal como aquellos originarios de células epiteliales (carcinoma), tejido conjuntivo (sarcoma), células reproductoras (seminoma y disgerminoma), células precursoras o embrionarias (blastoma) o células hematopoyéticas (linfoma y leucemia).

30 TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento también puede usarse para tratar

i) cánceres no hematopoyéticos tales como aquellos originarios de células epiteliales (carcinoma), tejido conjuntivo (sarcoma), células reproductoras (seminoma y disgerminoma), células precursoras o embrionarias (blastoma),

35 ii) cánceres originarios de células epiteliales (carcinoma) tales como adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma anaplásico, carcinoma de células grandes o carcinoma de células pequeñas,

iii) carcinoma derivado de células en el páncreas tal como, pero no limitado a, adenocarcinoma ductal,

40 iv) carcinoma derivado de los ovarios tal como carcinoma ovárico,

v) carcinoma derivado de la vejiga urinaria,

45 vi) carcinoma derivado del pulmón,

vii) carcinoma derivado del hígado,

viii) carcinoma derivado del riñón tal como carcinoma de células renales,

50 ix) carcinoma derivado del colon,

x) carcinoma derivado de la mama,

55 xi) carcinoma derivado de la piel,

xii) tumores neuroendocrinos, independientemente de su localización,

xiii) cáncer derivado de la próstata,

60 xiv) cáncer derivado del cerebro tal como glioblastoma,

xv) cánceres originarios de células de origen mesenquimatoso tales como aquellos de hueso, cartílago, grasa, músculo y tejidos vasculares o hematopoyéticos (sarcoma),

65 xvi) sarcoma derivado de hueso tal como osteosarcoma o cartílago tal como condrosarcoma,

- xvii) sarcoma derivado de grasa tal como liposarcoma o músculo liso tal como leiomiomasarcoma,
- xviii) sarcoma de tejidos blandos que incluye sarcoma alveolar de partes blandas, angiosarcoma, cistosarcoma filodes, dermatofibrosarcoma protuberante, tumor desmoide, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, sarcoma epiteloide, condrosarcoma extraesquelético, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, linfosarcoma, sarcoma polimorfo indiferenciado, tumor maligno de la vaina de los nervios periféricos, neurofibrosarcoma, rabdomiomasarcoma y sarcoma sinovial,
- xix) sarcoma de Ewing,
- xx) cánceres hematopoyéticos tales como aquellos originarios de células hematopoyéticas (linfoma y leucemia),
- xxi) cánceres hematopoyéticos tales como aquellos originarios de células hematopoyéticas del linaje linfoide tales como, pero no limitados a, linfoma de Hodgkin o no Hodgkin, o linfoma de células T,
- xxii) cánceres hematopoyéticos tales como aquellos originarios de células hematopoyéticas del linaje linfoide tales como, pero no limitados a, linfoma no Hodgkin,
- xxiii) cánceres hematopoyéticos tales como aquellos originarios de células hematopoyéticas del linaje linfoide tales como, pero no limitados a, leucemia de células B tal como leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda de precursores de células B,
- xxiv) cánceres hematopoyéticos tales como aquellos originarios de células hematopoyéticas del linaje mieloide tales como, pero no limitados a, leucemia mieloide aguda o leucemia mieloide crónica,
- xxv) cáncer con localización primaria desconocida,
- xxvi) cáncer primario local,
- xxvii) cáncer localmente avanzado,
- xxviii) metástasis individuales,
- xxix) propagación de enfermedad cancerosa diseminada,
- xxx) enfermedad infecciosa,
- xxxi) infecciones virales tales como, pero no limitadas a, infección de citomegalovirus (CMV), infección del virus de Epstein-Barr (VEB) o infección adenoviral,
- xxxii) infecciones virales tales como, pero no limitadas a, infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH),
- xxxiii) infecciones virales tales como, pero no limitadas a, virus de la gripe o virus de SR,
- xxxiv) trastornos linfoproliferativos tales como, pero no limitados a, macroglobulinemia de Waldenström,
- xxxv) disfunciones inmunitarias tales como síndrome de hiper IgM,
- xxxvi) disfunciones inmunitarias en las que reacciones inmunitarias en curso necesitan inclinarse a la inmunidad de tipo Th1,
- xxxvii) las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en medicina humana,
- xxxviii) las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en pacientes adultos humanos,
- xxxix) las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en pacientes pediátricos humanos,
- xxxx) tratar las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en medicina veterinaria,
- xxxxi) las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en perros,
- xxxxii) las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en gatos.
- xxxxiii) las enfermedades, tal como se define en el presente documento, en caballos.

Uso de TMZ-CD154 en combinación con inmunomoduladores

TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento puede combinarse con una o más de otras moléculas activas. Las moléculas pueden usarse sin o con los mismos o diferentes sistemas de vectores.

Las moléculas activas adecuadas se mencionan a continuación.

Las moléculas activas pueden ser otros genes inmunomoduladores en forma de ADN, ADNc, ARN, ARNm, nucleótidos o proteína. El otro agente activo pueden ser uno o más inmunomoduladores naturales tales como, por ejemplo, inmunomoduladores naturales pertenecientes a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF)/receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR).

TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, también puede usarse combinado con ligando de 4-1BB de tipo natural, y/o combinado con citocina o receptores de citocina de tipo natural.

Adicional o alternativamente, TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, puede combinarse con una o más interleucinas. Las interleucinas pueden ser interleucina-2, 7, 15 y/o 21. Por tanto, el agente activo que va a combinarse con TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, puede ser interleucina-2, interleucina-7, interleucina-15 o interleucina-21.

TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, también puede combinarse con uno o más factores de crecimiento de tipo natural o uno o más receptores del factor de crecimiento. Tales receptores pueden ser receptor de tipo natural del factor de crecimiento transformador beta (TGF β), señuelo del receptor del TGF β o receptor dominante negativo del TGF β .

TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, también puede combinarse con moléculas tal como se definió anteriormente, pero que se modifican del formato de tipo natural. Por ejemplo, los nucleótidos o aminoácidos pueden haberse alterado pero aún muestran la misma o mejorada función inmunoestimuladora, o la molécula puede haberse alterado y/o fusionado con otros dominios creando proteínas quiméricas. Por ejemplo, el dominio extracelular y el dominio transmembrana del ligando de 4-1BB pueden fusionarse con un dominio de TMZ para crear un ligando de 4-1BB trimerizado unido a membrana.

TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, puede combinarse con un dominio extracelular del ligando de 4-1BB y un dominio transmembrana puede fusionarse con un dominio de TMZ para crear un ligando de 4-1BB trimerizado unido a membrana.

TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, también puede combinarse con moléculas señuelo para inhibir, alterar o activar rutas de señalización. La molécula señuelo puede ser un anticuerpo, un fragmento de cadena sencilla derivado de un anticuerpo, un receptor, un ligando o parte del mismo.

La molécula señuelo tal como se definió anteriormente puede ser una molécula señuelo, que inhibirá o alterará el ligamiento receptor de interleucina-6 (IL6)/IL6.

Por tanto, la molécula señuelo puede ser un scFv que selecciona como diana el receptor de IL6, o un scFv que selecciona como diana la molécula IL6.

Alternativa o adicionalmente, la molécula señuelo definida anteriormente puede ser una molécula señuelo, que inhibirá la ruta STAT3, gremlina-1, el ligamiento de IL10/receptor de IL10 o arginasa-I.

TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, puede combinarse con cualquiera de los moduladores definidos anteriormente en el mismo sistema vehicular (vehículos genéticos, celulares o artificiales) tal como se define en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos TMZ-CD154 puede estar en posición *trans* con la secuencia de nucleótidos del ligando de 4-1BB en un vector genético.

La combinación de TMZ-CD154 y otro modulador puede situarse en posición *trans* en un sistema vectorial y separarse por una secuencia IRES o similar para permitir la expresión de ambos genes, o la combinación de TMZ-CD154 y otro modulador puede situarse en posición *trans* en un sistema vectorial separado por una secuencia para un péptido 2A o similar que permite traducir un transcrito de gen único para los dos moduladores que separan dos entidades postraduccionales.

Combinación de TMZ-CD154 con uno o más inmunomoduladores para su uso en medicina

Los nucleótidos o las proteínas según la invención, en particular TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento, pueden combinarse con cualquiera de los moduladores tal como se define en el presente documento en los diferentes sistemas vehiculares (vehículos genéticos, celulares o artificiales) tal como se define en el presente documento, pero usarse juntos para tratar enfermedades. Por ejemplo, dos vehículos que portan TMZ-CD154 y

ligando de 4-1BB, respectivamente, pueden usarse simultáneamente o a diferentes puntos de tiempo durante el tratamiento de, pero no limitado a, cáncer o enfermedad infecciosa.

5 Los vehículos pueden ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 y el otro vehículo puede ser un vector adenoviral dotado de ligando de 4-1BB.

Uno de los vehículos también puede ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 y el otro vehículo puede ser un vector adenoviral dotado de un scFV anti-receptor de IL6.

10 Alternativamente, uno de los vehículos puede ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 y el otro vehículo puede ser otro sistema vectorial dotado de ligando de 4-1BB, o

uno de los vehículos puede ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 y el otro vehículo puede ser otro sistema vectorial dotado de un scFV anti-receptor de IL6.

15 El vehículo también puede ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 combinado con ligando de la proteína 4-1BB, o

20 el vehículo puede ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 combinado con un anticuerpo o scFv que bloquea el receptor de IL6, o

el vehículo puede ser un vector adenoviral dotado de TMZ-CD154 combinado con un anticuerpo o scFv que bloquea IL6.

25 *TMZ-CD154 para su uso en combinación con tratamientos aprobados*

Los nucleótidos y las proteínas según la invención, por ejemplo TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, también pueden combinarse con tratamientos aprobados para enfermedades tales como diferentes fármacos, radioterapia o cirugía.

30 Por tanto, los nucleótidos y proteínas según la invención, por ejemplo TMZ-CD154, tal como se define en el presente documento, pueden combinarse con, por ejemplo,

35 i) terapias inmunomoduladoras aprobadas,

ii) agentes terapéuticos basados en anticuerpo-cuerpo aprobados tales como, pero no limitados a, trastuzumab (anti-Her2), rituximab (anti-CD20), tocilizumab (anti-IL6R), ipilimumab (anti-CTLA-4), nivolumab (anti-PD1) y pembrolizumab (anti-PD1).

40 iii) terapias de células inmunitarias aprobadas tales como, pero no limitadas a, terapia de células T (que selecciona como diana de manera natural tal como linfocitos infiltrantes de tumores expandidos, o diseñada genéticamente por ingeniería genética tal como células T con CAR o células T TcR diseñadas por ingeniería genética), terapias de linfocitos citolíticos naturales o vacunas de células dendríticas,

45 iv) terapia de células T aprobada (células T que seleccionan como diana tumores de manera natural tales como linfocitos infiltrantes de tumores expandidos, o diseñadas genéticamente por ingeniería genética tales como células T con CAR o células T TcR diseñadas por ingeniería genética),

50 v) terapia de linfocitos citolíticos naturales aprobada,

vi) vacuna de células dendríticas aprobada,

vii) vacunas aprobadas tales como, pero no limitadas a, vacunas de células tumorales, péptidos de antígenos tumorales o virales u otros antígenos virales o bacterianos,

55 viii) vacunas de células tumorales aprobadas,

ix) péptidos de antígenos tumorales o virales aprobados,

60 x) antígenos virales o bacterianos aprobados tales como, pero no limitados a, péptido o proteína de longitud completa pp65 de CMV, bacilo de Calmette-Guérin (BCG) o nucleótidos CpG no metilados,

65 xi) moduladores inmunitarios aprobados que incluyen, pero no limitados a, imiquimod, interferones (tales como IFN gamma, IFN alfa), interleucinas/citocinas (tales como IL2) y factores de crecimiento (tales como GM-CSF),

xii) tratamientos de cáncer aprobados que incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes antimicrotubulares,

- inhibidores de topoisomerasa y antibióticos citotóxicos,
- xiii) quimioterapia para cáncer aprobada tal como, pero no limitada a, agentes alquilantes incluyendo mecloretamina, bendamustina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida, busulfán, N-nitroso-N-metilurea, carmustina, lomustina, semustina, fotemustina, estreptozotocina, dacarbaxina, mitozolomida, temoxolomida, tiotepa, mitomicina, diaziquona, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbaxina y hexametilmelamina,
- xiv) ciclofosfamida,
- xv) bendamustina,
- xvi) temoxolomida.
- xvii) cisplatino, carboplatino u oxaliplatino,
- xviii) quimioterapia para cáncer aprobada tal como, pero no limitada a, antimetabolitos tales como antifolatos, fluoropirimidinas, análogos de desoxirribonucleósidos y tiopurinas,
- xix) un antifolato tal como metotrexato o pemetrexed,
- xx) una fluoropirimidina tal como fluorouracilo o capecitabina,
- xxi) un análogo de desoxirribonucleósido tal como citarabina, gemcitabina, decitabina, vidaza, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina o pentostatina,
- xxii) una gemcitabina,
- xxiii) una tiopurina tal como tioguanina o mercaptopurina,
- xxiv) quimioterapia para cáncer aprobada tal como, pero no limitada a, agentes antimicrotubulares tales como alcaloides de la vinca, taxanos u otros fármacos que bloquean la formación de microtúbulos o que estabilizan microtúbulos,
- xxv) vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina o vinflunina,
- xxvi) paclitaxel o docetaxel,
- xxv) etopósido, tenipósido u otros agentes que bloquean la formación de microtúbulos o que estabilizan microtúbulos,
- xxvi) quimioterapia para cáncer aprobada tal como, pero no limitada a, inhibidores de topoisomerasa,
- xxvii) irinotecán, topotecán o camptotecina,
- xxviii) quimioterapia para cáncer aprobada tal como, pero no limitada a, antibióticos citotóxicos,
- xxix) doxorubicina, daunorubicina, pirarrubicina, aclarrubicina, mitoxantrona,
- xxx) tratamientos de cáncer aprobados que incluyen radioterapia tal como radioterapia de haz externo, braquiterapia y terapia radioisotópica,
- xxxi) radioterapia de haz externo tal como radioterapia de haz externo convencional, radiación estereotáctica, simulación virtual, radioterapia conformada tridimensional/radioterapia de intensidad modulada, terapia de partículas y terapia Auger,
- xxxii) braquiterapia,
- xxxiii) terapia radioisotópica,
- xxxiv) tratamientos de cáncer aprobados que incluyen inhibidores de la angiogénesis,
- xxxv) bevacizumab o afibercept,
- xxxvi) tratamientos de cáncer aprobados que incluyen inhibidores de la ruta,
- xxxvii) inhibidores de EGFR, RET, BRAF mutado, tirosina cinasas, mTOR, Hedgehog, Smo, PI3K, MEK, AKT, RAF,

Rac1, PARP, PIM, cMET, STAT3, JAK2, p38MAPK, NOTCH, BCL-2, IAP, p53, GSK2, Chk1, CDK4/6, PDGFR, IGF-1R, DKK1, CF-1R o TWEAK:Fn14,

xxxviii) inhibidores de BRAF mutado que incluyen V600E tal como vemurafenib,

xxxix) inhibidores de tirosina cinasas tales como, pero no limitados a, imatinib, dasatinib, nilotinib y sunitinib,

xxxx) inhibidores de STAT3,

xxxxi) inhibidores de Rac-1,

xxxxii) inhibidores de BCL-2,

xxxxiii) inhibidores de inhibidores de la apoptosis tales como, pero no limitados a, ABT-737 o navitoclax,

xxxxv) tratamientos antivirales aprobados,

xxxxvi) tratamientos antivirales aprobados que incluyen, pero no limitados a, abacavir, aciclovir, adefovir, atazanavir, boceprevir, cidofovir, darunavir, delavirdina, efavirenz, entecavir, foscarnet, ganciclovir, lamivudina, oseltamivir, valaciclovir, valganciclovir,

xxxxvii) aciclovir, foscarnet, ganciclovir o valganciclovir,

xxxxviii) foscarnet, ganciclovir y valganciclovir.

Vías de administración

En principio, puede usarse cualquier vía de administración siempre que se obtenga el efecto esperado. En general, se prevé la administración parenteral.

Por tanto, la secuencia de nucleótidos según la invención puede administrarse por la vía de administración parenteral tal como por inyección intravenosa, por inyección percutánea, por inyección directamente a un órgano o tejido enfermo o por inyección intratumoral. En el último caso, la administración puede tener lugar por inyección guiada por imagen a un tumor.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario tales como cáncer y enfermedades infecciosas. Los ejemplos de tales enfermedades se proporcionan en el presente documento. Una composición farmacéutica de la invención comprende TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento en un vehículo genético tal como se define en el presente documento.

Las composiciones pueden diseñarse para administración oral, parenteral o mucosa. Por tanto, la administración puede ser oral, sublingual, de aplicación a la mucosa oral, o puede ser intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intratumoral, etc., o puede aplicarse a la piel o a la superficie mucosa incluyendo mucosa ocular, bucal, nasal, vaginal y rectal. Sin embargo, se contempla que la vía de administración parenteral es la más eficaz, en particular la inyección directamente al área enferma tal como inyección directamente a un tumor o una metástasis.

La composición puede estar en forma sólida, semisólida o líquida.

Las composiciones sólidas adecuadas incluyen polvos, gránulos, grageas, cápsulas, comprimidos (incluidos los comprimidos recubiertos), sobres, implantes, dispositivos de administración de fármacos, películas, etc.

Las composiciones semisólidas adecuadas incluyen geles, pastas, cremas, pomadas, óvulos vaginales, supositorios, etc.

Las composiciones líquidas o fluidas adecuadas incluyen disoluciones, dispersiones, emulsiones, suspensiones, lociones, pulverizadores, aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles. También puede estar en forma de líquido, que solidifica una vez que se inyecta de manera local, por ejemplo, a un tumor. También puede estar en forma de un implante, inserto o dispositivo de administración.

Para uso parenteral, la composición puede estar, por ejemplo, en forma líquida conteniendo TMZ-CD154 en un

- vehículo genético en un medio de disolvente o de dispersión tal como agua, etanol, propilenglicol, isopropanol, glicerol, aceite vegetal como, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o similares. Pueden añadirse aditivos como, por ejemplo, agentes de tamponamiento, agentes de ajuste del pH, agentes solubilizantes, agentes estabilizantes, conservantes, etc. Además, puede contener excipientes, que son farmacéuticamente aceptables para una composición que va a inyectarse. Estos pueden ser en particular soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato, cloruro de sodio) o secas, especialmente composiciones liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica u otro medio de disolvente o de dispersión, se reconstituyen dando una composición lista para usar.
- De manera ventajosa, tales aditivos pueden disolverse en el disolvente. Para potenciar la estabilidad, la composición puede congelarse después de introducirla en el vial y eliminar el agua a vacío. El polvo liofilizado seco se sella luego en el vial y puede suministrarse un vial concomitante de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso.
- La composición también puede presentarse como una composición congelada, que se descongela antes de la terapia. Podría ser, por ejemplo, una composición que contiene un vector viral. Una composición de este tipo puede usarse como tal o pueden añadirse aditivos tales como medio acuoso que comprende, por ejemplo, sustancias de tamponamiento, agentes de regulación del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, etc.
- Las composiciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en contacto la molécula activa (TMZ-CD154 portada por un vehículo) con el portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan poniendo en contacto de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si fuera necesario, dando forma al producto.
- Tal como se mencionó anteriormente, la secuencia de nucleótidos o proteína según la invención, por ejemplo TMZ-CD154, contenida en un vehículo genético puede administrarse por vía oral en forma de una composición farmacéutica. Dependiendo del trastorno y del paciente que va a tratarse, así como la vía de administración, las composiciones pueden administrarse en dosis variables.
- Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.
- Tales comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. De manera adicional, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.
- Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos en este aspecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materias colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- Un comprimido puede fabricarse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma suelta tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (por ejemplo, povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivos o agentes dispersantes. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse de manera que se proporcione una liberación lenta o controlada del principio activo que se está usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado.
- Las composiciones para su uso según la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo puede estar presente también como bolo, electuario o pasta.
- Debe entenderse que además de los ingredientes particularmente mencionados anteriormente, las formulaciones de

esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica que tienen en consideración el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

5 Tal como se muestra en los ejemplos en el presente documento, puede usarse una secuencia de nucleótidos según la invención en una composición, que está en forma de una composición acuosa, en la que el medio acuoso es un medio fisiológicamente aceptable normalmente usado para inyección. Tal medio acuoso puede ser cloruro de sodio al 0,9%, disolución de Ringer o una disolución tampón de Tris/glicerol.

10 Cuando TMZ-CD154 se administra a través de un virus (tal como se observa a partir de los ejemplos en el presente documento), el virus que contiene el nucleótido según la invención puede purificarse mediante ultracentrifugación (usando, por ejemplo, cloruro de cesio) y el virus concentrado se dializa en una disolución tampón de Tris/glicerol (que contiene Tris 20 mM, cloruro de sodio 25 mM, glicerol al 2,5% p/v, pH ajustado a pH 8,0). Por tanto, el nucleótido se administra en el tampón y si fuera necesario, el tampón puede diluirse con la misma disolución tampón de Tris/glicerol o una disolución adecuada para administración *in vivo*, por ejemplo una o las otras disoluciones mencionadas anteriormente.

Un experto en la técnica podrá preparar una composición que sea adecuada para su uso según la presente invención basándose en la divulgación en el presente documento y/o con la guía de Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Company, 1990 o ediciones más nuevas.

Una composición farmacéutica de la invención también puede contener TMZ-CD154 en combinación con uno o más de los inmunomoduladores mencionados en el presente documento o en combinación con uno o más de los otros agentes terapéuticamente activos mencionados en el presente documento. Tal composición puede contener o bien todos los elementos activos en la misma formulación (por ejemplo, en forma de una dosis unitaria, la dosis unitaria contiene todas las moléculas activas) o bien puede estar en forma de un paquete que contiene un conjunto de formulaciones conteniendo cada una una o más de las moléculas activas (por ejemplo, en forma de un paquete que contiene dos formulaciones diferentes, una conteniendo TMZ-CD154 en un vehículo y la otra conteniendo la otra molécula activa; o en forma de un paquete que contiene por ejemplo dos formulaciones diferentes, una conteniendo TMZ-CD154 en un vehículo y un inmunomodulador, y la otra conteniendo otra molécula activa).

La dosificación que va a administrarse de una molécula TMZ-CD154 variará según la molécula particular, el vehículo que comprende la molécula, la enfermedad implicada, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, y la vía de administración seleccionada.

La dosificación apropiada puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

Las composiciones pueden contener desde el 0,1% en peso, preferiblemente desde el 5-95%, más preferiblemente desde el 10-60% en peso, de un compuesto de la invención, dependiendo del método de administración y la forma de TMZ-CD154 (por ejemplo, usada como una proteína o terapia génica). Los vectores adenovirales pueden estar en concentraciones que oscilan entre 1×10^6 y 1×10^{14} partículas virales por ml. Una dosis sugerida por tratamiento puede oscilar preferiblemente entre 1×10^9 y 1×10^{13} partículas virales por ml si se administra mediante inyección intratumoral o infusión intravenosa.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad óptima y el espaciado de dosificaciones individuales de un compuesto de la invención se determinará por la naturaleza y el grado de la afección que va a tratarse, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y la afección del sujeto particular que va a tratarse, y que un médico determinará finalmente las dosificaciones apropiadas que van a usarse. Esta dosificación puede repetirse de manera tan frecuente como sea apropiada. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación puede alterarse o reducirse, según la práctica clínica normal.

A continuación se ilustra el uso de TMZ-CD40L en medicina, en particular en inmunoterapia contra el cáncer.

Inmunoterapia contra el cáncer

Inmunología del tumor e inmunoterapia contra el cáncer

El sistema inmunitario puede reconocer y destruir células tumorales mediante los mismos mecanismos por los que reconoce y destruye células infectadas de manera viral para salvar al huésped de infecciones letales. Al igual que las células infectadas de manera viral, las células tumorales son células propias, y los epítomos asociados a virus o tumor están presentes en el complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH-I) en las células para los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL). Tanto las células infectadas de manera viral como las células tumorales pueden impedir el reconocimiento de CTL mediante regulación por disminución de moléculas de CMH, haciendo que las células sean dianas para linfocitos citolíticos naturales (NK). Sin embargo, los virus activan inicialmente una respuesta de defensa inmunitaria innata, alertando a las células que presentan antígenos tales como células dendríticas (DC) para activar la inmunidad antiviral, mientras que las células tumorales no inducen el mismo grado de estimulación. De hecho,

durante la progresión del cáncer, el tumor y su estroma producen sustancias que inhiben las células inmunitarias. La inmunidad tumoral se contiene bloqueando la maduración de DC y promoviendo la diferenciación y atracción de células inmunosupresoras al entorno tumoral. Estas células supresoras son habitualmente macrófagos M2, una variedad de células mieloides inmaduras denominadas de manera colectiva células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y células T reguladoras (Treg). Tales células producen citocinas y factores de crecimiento supresores tales como IL10, TGFβ, prostaglandina E2, arginasa I y peroxidasa mieloide. En el entorno tumoral, los CTL activados se suprimen rápidamente por estos factores y se vuelven anérgicos, un estado de falta de respuesta reversible, o mueren.

La esencia de la inmunoterapia contra el cáncer es romper la tolerancia tumoral (por ejemplo, romper la anergia) y revertir las respuestas inmunitarias en curso de tipo 2 a tipo 1. El tipo 1 se caracteriza por la activación de linfocitos T cooperadores 1 (Th1), CTL, linfocitos citotóxicos naturales y macrófagos M1 así como por una agrupación de citocinas tales como IFNγ, IL12, IL21 y TNF.

El éxito reciente de anticuerpos de bloqueo del punto de control que seleccionan como diana CTLA4 y PD1/PDL1 para melanoma y otros tumores malignos sólidos así como células T con receptor de antígeno quimérico (CAR) para tumores malignos de células B ha fortalecido mucho el campo de inmunoterapia contra el cáncer. Los conceptos novedosos para tratar el cáncer estimulando el sistema inmunitario se están investigando actualmente. Uno de estos conceptos es terapia génica inmunoestimuladora que utiliza virus oncolíticos como vehículos de inserción de genes.

Terapia génica inmunoestimuladora

La terapia génica inmunoestimuladora se dirige a transferir genes que codifican para proteínas inmunoestimuladoras en el área tumoral. Los primeros estudios que usan terapia génica inmunoestimuladora en modelos experimentales se publicaron a finales de los noventa con resultados prometedores. Se usaron también diferentes enfoques en ensayos clínicos pero muchos no lograron mostrar eficacia. Sin embargo, estos estudios se realizaron antes del conocimiento aumentado de células inmunitarias supresoras que se infiltran en el tumor y la posibilidad de ayudar a las respuestas inmunitarias usando precondicionamiento o quimioterapia de apoyo que reduce los niveles de estas células inmunosupresoras. Además, las respuestas a la inmunoterapia siguen un transcurso diferente en comparación con la quimioterapia o irradiación tradicional. El hinchamiento inicial del tumor debido a la inflamación puede haberse malinterpretado como una progresión que conduce a la interrupción prematura del tratamiento. La combinación de precondicionamiento/quimioterapia de apoyo junto con la conciencia sobre cómo interpretar los datos probablemente allanará el camino para la terapia génica inmunoestimuladora al igual que tiene para otras inmunoterapias. En comparación con la administración sistémica de citocinas, factores de crecimiento y anticuerpos inmunoestimuladores solubles, la terapia génica puede administrarse a un sitio distinto con días a semanas de expresión de los transgenes inmunoestimuladores dependiendo del vector usado. Esto conduce a una alta concentración de las proteínas inmunoestimuladoras en el tumor que reducen la toxicidad debido a la retirada innecesaria de la tolerancia a células propias que pueden verse tras la activación inmunitaria sistémica.

Los genes inmunoestimuladores terapéuticos se insertan en el tumor mediante el uso de una gran variedad de vehículos. Los adenovirus deficientes en replicación se han usado habitualmente ya que portan casetes transgénicos grandes. Desafortunadamente, la expresión del transgén es de duración limitada porque los adenovirus no se integran en el genoma de la célula huésped. La falta de integración aumenta la seguridad ya que el riesgo de mutagénesis de la célula huésped es improbable. Además, los seres humanos están completamente equipados para manejar infecciones adenovirales. Por ejemplo, la mayoría de individuos han tenido infecciones de las vías respiratorias altas debido a adenovirus y han desarrollado anticuerpos contra varios serotipos, y células T de reacción cruzada con todos. Para la terapia génica inmunoestimuladora, el efecto inmunoestimulador del virus puede ayudar a la formación de respuestas antitumorales activando los TLR en DC cargadas con antígenos tumorales. Sin embargo, tras la administración intratumoral, el virus infecta a las células en el tubo de la aguja y existe la necesidad de aumentar la infección del virus para prolongar la expresión del transgén. Esto puede lograrse usando virus oncolíticos como vehículos de administración génicos.

Terapia de virus oncolíticos (OV)

La capacidad de determinados virus para infectar células, propagarlas y destruirlas mediante lisis durante la liberación de nuevos viriones significa que pueden utilizarse como tratamientos para el cáncer. Para limitar la oncólisis a células tumorales, la expresión de los genes de replicación del virus se restringe añadiendo promotores que son activos preferentemente en el tumor. Para un completo beneficio, los OV deben infectar todas las células tumorales, lo que puede ser un reto si el tumor ha metastatizado. Dado que la propagación viral sistémica al tumor distal puede limitarse por el sistema inmunitario, se está intentando desarrollar OV menos inmunogénicos.

En lugar de disminuir la inmunogenicidad de los OV, otro enfoque es utilizar y reforzar su capacidad inmunoestimuladora intrínseca del virus añadiendo genes inmunoestimuladores en el genoma del OV. Los adenovirus oncolíticos dotados de transgenes inmunoestimuladores los administran con éxito al tumor y dotan de una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica activa contra la enfermedad metastásica. La eficacia completa de la oncólisis combinada y la estimulación inmunitaria es difícil de determinar en modelos murinos ya que la oncólisis

está limitada en células murinas y el efecto inmunestimulador no puede evaluarse en modelos de xenoinjerto en ratones inmunodeficientes. Ha habido al menos un estudio publicado que usa un adenovirus oncolítico que porta el gen CD40L humano de cadena completa a pacientes con cáncer de fase terminal demostrando viabilidad y seguridad. Hay otros estudios en curso que usan GM-CSF dotado de virus oncolíticos, y un virus del herpes simple dotado de GM-CSF (talimogene laherparepvec) ya ha completado los ensayos de registro de fase III en pacientes con melanoma.

Preacondicionamiento o quimioterapia de apoyo

El preacondicionamiento o la quimioterapia de apoyo se administra a menudo a pacientes que reciben inmunoterapia para disminuir las células inhibitoras del estroma tumoral tales como Treg y MDSC que de otro modo pueden dificultar la activación inmunitaria prevista. Además, la depleción de los linfocitos o células mieloides inducidos por quimioterapia puede inducir la producción de citocinas de la médula ósea que restablece las poblaciones celulares inmunitarias (es decir por replicación homeostática), y favorece la activación de respuestas antitumorales. Dependiendo del diagnóstico y del tipo de quimioterapia, el crecimiento del tumor también puede afectarse. Se ha administrado ciclofosfamida metronómica a pacientes que se someten a inmunoterapia en un intento de controlar las células inmunitarias supresoras. Tales protocolos de quimioterapia de apoyo pueden ser de gran valor si no impiden las respuestas antitumorales deseadas. Una quimioterapia de apoyo de interés de este tipo puede ser gemcitabina.

La gemcitabina es un análogo de nucleósido que reemplaza la citidina durante la replicación del ADN, y conduce a la detención del crecimiento y a la apoptosis. La gemcitabina también selecciona como diana ribonucleótido reductasa, bloqueando así la función de esta enzima. Actualmente, es un tratamiento habitual para el cáncer pancreático tanto como tratamiento adyuvante a la cirugía como tratamiento único para tumores avanzados. Aunque el tratamiento con gemcitabina de tumores metastatizados avanzados es solo paliativo, varios estudios, incluyendo este propio, han mostrado que los pacientes tratados con gemcitabina tenían niveles significativamente más bajos de la molécula inmunosupresora TGF, Treg y MDSC, pero un número aumentado de DC, monocitos y células T activadas. Recientemente, se ha mostrado que la gemcitabina redujo la incorporación de MDSC al tumor y aceleró el desarrollo de respuestas de células T antitumorales, lo que ayudó a la terapia de combinación con un reovirus oncolítico. En ratones, la gemcitabina redujo las MDSC y potenció la eficacia de la inmunoterapia.

Por tanto, una combinación de gemcitabina de tratamiento habitual con inmunoterapia puede ser beneficiosa para estos pacientes.

Producto de investigación LOAd703 que comprende TMZ-CD40L

LOAd703 es una inmunoterapia novedosa para el cáncer. Es un adenovirus oncolítico de serotipo 5 con una fibra (eje y perilla) del serotipo 35 (Ad5/35) para aumentar la unión a las células y por tanto su ineficacia. La replicación del virus y la oncólisis se restringe a células con una ruta de retinoblastoma disfuncional (Rb) debido a un dominio de unión E1Ad24 y E2F múltiple en el sentido de 5' de E1A. Rb en células normales se une al factor de transcripción E2F, inhibiéndose así su capacidad intrínseca para inducir la transcripción de genes que promueven la transición desde la fase G1 hasta la fase S del ciclo celular. Tras la fosforilación de Rb, E2F se libera para estimular la proliferación celular. Los tumores humanos tienen un amplio espectro de mutaciones que alteran la proteína Rb y/o factores que conducen a la hiperfosforilación de Rb. Por tanto, en las células cancerosas de E2F, es libre de impulsar la transcripción del virus. El virus infecta y destruye células tumorales a través de oncólisis debido a la replicación excesiva del virus mientras que las células benignas sanas pueden infectarse pero no se producen nuevas partículas virales. Por tanto, LOAd703 no destruye células sanas. LOAd703 tiene un casete transgénico con dos genes inmunostimuladores (TMZ-CD40L y 4-1BBL) impulsados por un promotor CMV. El promotor CMV no se restringe a los tejidos y los genes inmunostimuladores pueden expresarse en todas las células que están infectadas por LOAd703. Por tanto, LOAd703 selecciona como diana tanto el tumor como su estroma. Dado que el virus se administra mediante inyección intratumoral, la expresión de los transgenes se localiza en el área tumoral.

Constructo génico esquemático

La replicación de LOAd703 se controla a través de un E1A Δ 24 que restringe la replicación del virus en células con una proteína de retinoblastoma alterada (hiperfosforilada) observada comúnmente en células malignas. Además, una región de promotores de E2F y un sitio Sp-1 se han insertado antes de E1A. Estas restricciones de replicación promoverán la replicación del virus en células tumorales llevando finalmente al tumor a oncólisis y muerte. Los virus LOAd703 pueden infectar células normales pero no replica ni destruir células normales. Las modificaciones adicionales incluyen deleciones 6.7K y gp19K en la región E3. 6.7K inhibe el receptor de TRAIL 1 y 2 en la célula mientras que gp19K retiene MHC en el retículo endoplasmático (RE). Juntos, estos dos reducen la capacidad de las células T para reconocer y destruir células infectadas con virus. Dado que el fin de LOAd703 es potenciar la inmunogenicidad, estas regiones se eliminaron del genoma del adenovirus. La región del eje y de la perilla de la fibra del serotipo 5 situada en la región L5 se cambió por la región del eje y de la perilla de un virus de serotipo 35 que aumenta la traducción del virus ya que la fibra de 35 se une al receptor de CD46 expresado de manera abundante tanto en células humanas normales como en malignas mientras que la fibra de Ad5 se restringe a células positivas

para el receptor del adenovirus y del virus coxsackie. Después de la región L5, se insertó un casete transgénico con genes TMZ-CD40L y 4-1BBL impulsado por un promotor del citomegalovirus (pCMV). Tras la infección de células, el virus LOAd703 inducirá, por tanto, la expresión de TMZ-CD40L y 4-1BBL. La expresión se impulsa por el promotor del CMV y no es dependiente de la replicación del virus. Cualquier célula infectada dentro del tumor tras la inyección intratumoral puede expresar los transgenes.

El transgén TMZ-CD40L es un ligando CD40 humano modificado (CD40L; CD154) que carece del dominio de señalización intracelular y en su lugar fusiona los dominios extracelular y transmembrana a un dominio de cremallera de isoleucina. Esto crea una molécula CD40L trimerizada unida a membrana que carece de señalización intracelular en la célula que expresa TMZ-CD40L pero todavía se une y transmite señales a otras células que expresan su receptor CD40. CD40L se expresa normalmente en muchos tipos de células en condiciones patológicas, es decir cuando las células se estresan o activan. La estimulación de CD40L de células CD40+ conduce a diferentes acciones dependiendo de la identidad de la célula CD40+. Las DC inmaduras expresan CD40 y tras el estímulo de CD40L las DC se diferencian en un fenotipo maduro que expresa niveles potenciados de moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), moléculas coestimuladoras y citocinas. Tales DC maduras son excelentes estimuladores de células T (Th1 y CTL), linfocitos citolíticos naturales y macrófagos M1. Las células endoteliales CD40+ aumentan la expresión de moléculas importantes para la fijación y diapédesis de células T que promueven la incorporación de células T. Sin embargo, las células tumorales CD40+ tienen una ruta de señalización intracelular CD40 sesgada, y tras la estimulación de CD40L la mayoría de células tumorales presentan inhibición al crecimiento o entran en apoptosis. Además, la señalización mediada por CD40L en el microentorno del tumor puede reducir de manera indirecta el nivel de Treg en pacientes con cáncer de vejiga tratado con terapia génica con CD40L (AdCD40L). En un modelo murino, la población celular mieloide se inclinó de células CD11b+Gr1^{int/low} y M2 supresoras a CD11b+Gr1^{high} y células mieloides M1.

El transgén del ligando 4-1BB (4-1BBL; CD137L) es el gen 4-1BBL humano de longitud completa. Se une a su receptor 4-1BB (CD137) expresado en células T y linfocitos citolíticos naturales activadas. La estimulación de 4-1BBL de células T y linfocitos citolíticos naturales protege a las células de la muerte celular inducida por activación (AICD) a través de la regulación por incremento de inhibidores de la apoptosis tales como BCL-xL. La estimulación de 4-1BBL también promueve la proliferación eficaz de linfocitos. 4-1BBL es un buen estimulador *in vitro* tanto de CTL como de linfocitos citolíticos naturales, pero para la eficacia *in vivo* en modelos tumorales, la combinación de 4-1BBL con otros potenciadores inmunitarios parece crucial. La combinación de la estimulación de CD40L y de 4-1BBL, así como la estimulación del esqueleto adenoviral de receptores de tipo Toll (TLR) estimulan de manera potencial las DC, células T y linfocitos citolíticos naturales en las prácticas experimentales preclínicas descritas a continuación.

Por tanto, LOAd703 expresa CD40L y 4-1BBL y, por tanto, tiene dos mecanismos efectores principales: 1) inducción de la muerte celular a través de o bien la oncólisis o bien la apoptosis mediada por CD40, y 2) activación del sistema inmunitario a través de CD40L, 4-1BBL y el esqueleto adenoviral. La dotación efectora principal es probablemente la activación inmunitaria, pero la inducción de la muerte celular mediante oncólisis además fortalece las respuestas antitumorales debido a la liberación de antígenos tumorales que dan como resultado estimulación inmunitaria tumoral específica de antígeno.

Abreviaturas

45	aCTLA4	antígeno 4 del linfocito T anticitotóxico
	Ad	adenovirus
	AICD	muerte celular inducida por activación
50	CD	agrupación de diferenciación
	CD40L	ligando CD40, CD154
55	CMV	citomegalovirus
	CTL	linfocito T citotóxico
	DC	célula dendrítica
60	GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
	IFN γ	interferón gamma
65	IL	interleucina

	LOAD	adenovirus oncolítico Lokon
	MDSC	célula supresora derivada de mieloides
5	NK	linfocito citolítico natural
	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
	PDAC	adenocarcinoma ductal pancreático
10	PD1	receptor 1 de muerte programada
	PDL1	ligando 1 del receptor de muerte programada
15	Rb	retinoblastoma
	TCR	receptor de células T
	TGFb	factor de crecimiento y transformación beta
20	Th	linfocito T cooperador
	TLR	receptor de tipo Toll
25	TMZ-CD40L	CD40L trimerizado unido a membrana
	TNFa	factor de necrosis tumoral alfa
	Treg	linfocito T regulador
30	VP	partículas virales
	4-1BBL	ligando 4-1BB, ligando CD137

35 *Definiciones*

Ad5/35: el término “Ad5/35” significa un vector del adenovirus de serotipo 5 oncolítico, en el que la fibra y la perilla del eje son de serotipo 35 de Ad.

40 Antígeno: el término “antígeno” es una diana que se reconoce por células T a través del receptor de células T, un receptor de antígenos quiméricos o un equivalente del mismo.

45 ADNc: el término “ADNc” significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa de una molécula de ARNm cortada y empalmada, madura obtenida de una célula. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario, inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, incluyendo el corte y empalme, antes de aparecer como ARNm cortado y empalmado maduro.

50 Secuencia codificante: el término “secuencia codificante” significa un polinucleótido, que especifica de manera directa la secuencia de aminoácidos de TMZ-CD154 o una variante de la misma. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierto, que comienza con un codón de iniciación tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de parada tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de los mismos.

55 Expresión: el término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción de TMZ-CD154 incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

60 Célula huésped: el término “célula huésped” significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción o similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido tal como se describe en el presente documento.

65 Operativamente unido: el término “operativamente unido” significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de un polinucleótido, de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

Origen de replicación: el término “origen de replicación” significa la secuencia particular en el genoma en la que se inicia la replicación. Esto puede implicar la replicación del ADN en organismos vivos tales como procariontes y eucariotes, o la de ADN o ARN en virus tales como virus de ARN bicatenario.

5 Vector viral competente en replicación: el término “vector viral competente en replicación” es un virus que puede replicarse por sus propios medios en cualquier célula que infecte o en células de origen específico.

Vector viral deficiente en replicación: el término “vector viral deficiente en replicación” es un virus que no puede replicarse por sus propios medios debido a la delección de genes implicados en la replicación viral.

10 Identidad de secuencia: el término “identidad de secuencia” significa la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Algoritmos para consultas de nucleótidos: blastn, megablast, megablast no contiguo. Algoritmos para consultas de proteínas: blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast.

15 Vector viral: el término “vector viral” significa una herramienta para administrar material genético en células.

El término “que comprende” debe entenderse en un amplio sentido, pero abarca los términos “que contiene”, “que consiste en”, y en relación con una estructura molecular, la estructura puede ser tal como se muestra, es decir sin ningún elemento adicional.

20 *Leyendas de las figuras*

Figura 1: A) Una figura esquemática que muestra la molécula TMZ-CD154. B) Una figura esquemática que muestra la molécula TMZ-CD154 trimerizada en la membrana plasmática celular (PM) interactuando o no con el receptor CD40 en una célula diana vecina.

Figura 2: se transfectaron células 293 con un plásmido que contenía TMZ-CD154 o un plásmido simulado vacío. A) Después de dos días de cultivo, se lisaron las células y se analizó la suspensión de proteínas mediante electroforesis en gel e inmunotransferencia de tipo Western para detectar TMZ-CD154. Las muestras se dividieron en dos grupos en los que el primer grupo se llevó a ebullición en tampón reductor de muestra (R), y el otro grupo no se llevó a ebullición y se mezcló con un tampón no reductor de muestra antes de la electroforesis en gel. B) Después de dos días de cultivo, se analizó una porción de las células mediante citometría de flujo para demostrar la expresión de TMZ-CD154. C) Se analizaron los sobrenadantes de células Panc01, BxPc3, MiaPaca2 y PaCa3 transducidas con virus Ad5/35 que expresa TMZ-CD154, CD154 de tipo natural o sin transgenes (simulado) para determinar la liberación de CD154 solubles en los sobrenadantes usando ELISA. D) Se usó un serotipo 5/35 de adenovirus para transducir células T con la molécula TMZ-CD154. Los controles fueron transducidos o no con un virus vacío (simulado). Las células se cultivaron durante 48 h con o sin IL2.

Figura 3: se transdujeron células dendríticas (A) y células MiaPaCa2 (B) con 100 MOI del virus Ad5/35-TMZ-CD154 (línea roja), un virus simulado (línea verde) o se dejaron sin transducir (línea gris). Las DC también se transdujeron con otras dos versiones de virus Ad5/35-TMZ-CD154 combinadas con 4-1BBL (línea naranja) o scFv aIL6R (línea azul). Se analizaron las células 24 horas después para determinar la expresión de TMZ-CD154 mediante citometría de flujo. Las células no transducidas o transducidas con simulación no expresaron TMZ-CD154, mientras que las células transducidas con Ad5/35-TMZ-CD154 demostraron una expresión robusta que se expresó más que en células tumorales en comparación con las DC.

Figura 4: se transdujeron líneas celulares tumorales de cáncer de páncreas con el virus (oncolítico) competente en replicación de manera condicional (CRC) Ad5/35-TMZ-CD154, un virus oncolítico simulado (CRC), un virus simulado deficiente en replicación (RD) o se dejaron sin transducir. Se sembraron las células transducidas en placas de 96 pocillos y se analizaron para determinar la supervivencia usando el ensayo de viabilidad MTS para determinar el nivel de muerte celular por oncólisis de A) Panc01, B) MiaPaCa2 o C) BxPC3. D) Se realizó el mismo ensayo en una línea celular de linfoma (Karpas 422).

Figura 5: se cocultivaron células dendríticas inmaduras con células 293 transfectadas con TMZ-CD154, CD154 trimerizado soluble (st) (CD40L), CD154 soluble multimérico (CD40L) o plásmidos simulados, o se dejaron sin transfectar. Después de dos días de cocultivo, se analizaron las células mediante citometría de flujo para determinar la expresión de CD83 (A). Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la expresión de IL-12 usando ELISA (B).

Figura 6: se transdujeron células dendríticas inmaduras con virus Ad5/35-TMZ-CD154 o virus simulado, o se dejaron sin transducir (sólo DC). Después de dos días de cultivo, se analizaron las células mediante citometría de flujo para determinar la expresión de HLA-DR, CD86, CD70 y CD83 (A). Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para determinar la expresión de IL-12 usando ELISA (B).

Figura 7: se cultivaron células mononucleares CD14 de un donante positivo para CMV con células dendríticas transducidas con virus Ad5/35-TMZ-CD154 y pulsadas con péptidos pp65 de CMV durante 11 días. En el día 11, se

analizaron las células para determinar la presencia de células T específicas de CD3+CD8+tetrámero+CMV mediante citometría de flujo. Sólo el 0,5% de las células T fueron específicas de CMV antes del cultivo, y más del 60% de las células T fueron específicas de CMV después del cultivo.

5 **Figura 8:** se transdujeron y se cultivaron células mononucleares de caballo con un vector adenoviral con el gen humano CD154. Después de una semana, se expandió la población de linfocitos (A, derecha) en comparación con células transducidas simuladas (izquierda). Se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron usando un ELISA de anti-MCP-1 de caballo. El virus simulado activa MCP-1 pero el virus CD154 proporciona una expresión mejorada.

10 **Figura 9:** se hizo crecer de manera subcutánea la línea celular Panc01 en ratones Nu/Nu que carecían de un sistema inmunitario funcional. Se inyectaron los tumores 1x con 1×10^6 VP de adenovirus oncolítico que expresa TMZ-CD154 o PBS. El % de crecimiento del tumor se muestra con el tiempo a partir de la inyección viral.

15 **Figura 10:** se transfectaron células 293 con plásmidos que contenían TMZ-CD154 en combinación con 4-1BBL (A, B) o scFv aIL6R (C, D) y se analizaron para determinar la expresión de CD154 (A, C) o 4-1BBL (B) mediante citometría de flujo. Se analizó el sobrenadante de células que expresan scFv aIL6R con un marcador myk mediante ELISA para determinar la expresión de aIL6R (D).

20 **Figura 11:** se transdujeron DC con virus Ad5/35 con TMZ-CD154 en combinación con 4-1BBL o las células se dejaron sin transducir o se transdujeron con un virus simulado vacío. Después de dos días de cocultivo, se analizaron las células para determinar la expresión de TMZ-CD154 y 4-1BBL mediante citometría de flujo.

25 **Figura 12:** se transdujeron células dendríticas inmaduras humanas con virus Ad5/35 con solo TMZ-CD154 o en combinación con 4-1BBL o scFv aIL6R, o las células se dejaron sin transducir o se transdujeron con un virus simulado vacío. Después de dos días de cocultivo, se analizaron las células para la expresión de CD83 mediante citometría de flujo.

30 **Figura 13:** se transdujeron células dendríticas inmaduras humanas con virus Ad5/35 con solo TMZ-CD154 o en combinación con 4-1BBL o scFv aIL6R, o las células se dejaron sin transducir o se transdujeron con un virus simulado vacío. Después de dos días de cocultivo, se analizaron las células para la expresión de CD70 mediante citometría de flujo.

35 **Figura 14:** se transdujeron células dendríticas inmaduras humanas con virus Ad5/35 con solo TMZ-CD154 o en combinación con 4-1BBL o scFv aIL6R, o las células se dejaron sin transducir. Después de dos días de cocultivo, se analizaron los sobrenadantes mediante Luminex para comparar los niveles de IFN γ (A), IL12 (B), TNFa (C) e IL21 (D) entre los grupos.

40 **Figura 15:** se expandieron células T específicas de CMV de células mononucleares preparadas a partir de un donante de sangre positivo para CMV expandiendo células CD14 con células dendríticas transducidas pulsadas con péptidos pp65 de CMV. Se transdujeron las células dendríticas con un virus simulado, el virus Ad5/35 con TMZ-CD154 solo o en combinación con 4-1BBL o aIL6R. En el día 11, se recolectaron las células y se analizaron para determinar el porcentaje de células T (específicas de CMV) positivas de tetrámero usando citometría de flujo y en comparación con el valor de previo a la expansión en A. En B, se muestra el número total de células expandidas en los diferentes grupos. El virus Ad5/35 que contenía tanto TMZ-CD154 como 4-1BBL (LOAd703) también pudo expandir linfocitos citolíticos naturales en los cultivos (C).

45 **Figura 16:** se cultivó la línea celular pancreática PaCa3 solo o con gemcitabina (G) 100 μ M. Se transdujeron también células PaCa3 con virus Ad5/35 que expresan TMZ-CD154 solo o en combinación con ligando 4-1BB o scFv aIL6R. Finalmente, se cultivaron las células transducidas con gemcitabina 100 μ M. Se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se analizaron para determinar la supervivencia usando el ensayo de viabilidad MTS para determinar el nivel de muerte celular por oncólisis, por gemcitabina o por la combinación de oncólisis y gemcitabina. * indica diferencias de $p < 0,05$. B) Se hicieron crecer células tumorales pancreáticas murinas Panc02 en ratones C57BL6 y se trataron con un adenovirus oncolítico que porta TMZ-CD154+4-1BBL dos veces a la semana 6x +/- semanalmente (3x) con gemcitabina (25 mg/kg). Se muestra el crecimiento del tumor. C) Se transdujeron células pancreáticas humanas Panc01 igual que en (A) anteriormente y se cultivaron con o sin paclitaxel (2 μ M). * indica diferencias de $p < 0,05$.

50 **Figura 17:** se trataron ratones C57BL/6 con células tumorales de cáncer de vejiga de MB49 creciente con 1 infusión intratumoral de un vector adenoviral que porta el gen CD154 murino. Se tomaron biopsias 24 horas después para la determinar la inmunohistoquímica que detecta células CD11b y GR-1 mediante microscopía confocal (A) y para determinar la citometría de flujo después de la alteración mecánica en la única suspensión celular que detecta células T infiltrantes de tumor CD3+CD107a+.

65 **Figura 18:** se transdujeron células endoteliales humanas (HUVEC) con virus Ad5/35 que contenían TMZ-CD154 con y sin o bien 4-1BBL o bien aIL6R, o un virus sin transgenes (simulado), o se dejaron sin transducir. Después de 48 h de cultivo, se analizaron las células mediante citometría de flujo para determinar la expresión de E-selectina e ICAM-

l que son importantes para la fijación y diapédesis de linfocitos a través del endotelio en tejidos inflamados.

Figura 19: la oncólisis se restringe a células tumorales. Se transdujeron células tumorales (Panc01 se muestra en la figura) y células pancreáticas exocrinas sanas de control con LOAd703, un virus LOAd (-) que carece de transgenes, y virus simulado Ad5/35 que carece de capacidad para replicarse a través de delección E1/E3, o se dejaron sin transducir. Se cultivaron las células en replicados en placas de 96 pocillos y se analizaron para determinar la viabilidad usando un ensayo MTS. Una viabilidad baja da un absorbancia baja.

Figura 20: test de toxicidad en el modelo sanguíneo en bucle. Se sometió a prueba sangre de 5 donantes sanos para determinar la reactividad a LOAd703. La sangre se hacía circular en bucles heparinizados (2 ml/bucle) que no afectan a los complementos durante cuatro horas. Se tomaron las muestras de plasma antes del ensayo y 4 horas después de la adición de LOAd703 a dosis alta (1×10^8 VP) o dosis baja (1×10^7 VP). Como control negativo, se añadió PBS al bucle y se usó un anticuerpo anti-CD28 como control positivo. AdCD40L es un virus similar a LOAd703 que se ha usado clínicamente y se sometió a prueba a dosis alta (1×10^8 VP).

Figura 21: se trataron tumores B16 que crecían de manera subcutánea en ratones C57BL6 con AdCD40L donde después se infundieron células T pmel que reconocen tumores B16. Se analizaron luego los tumores mediante citometría de flujo para determinar la presencia de células T. A) Células T pmel pudieron infiltrar el tumor, sin embargo, si el tumor se trataba previamente con AdCD40L (combo), la infiltración de células T pmel aumentaba de manera drástica. B) En los tumores tratados con AdCD40L, aumentaron tanto las células T naturales como las pmel en comparación con los tumores que no se trataron previamente con AdCD40L y que expresaron el marcador de activación CD107a.

Figura 22: programa de tratamiento para terapia de dosis única usando Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL (LOAd703) al nivel de dosis uno de 1×10^{11} VP y al nivel de dosis dos de 5×10^{11} VP. Los recuadros azul y blanco representan 1 semana.

Figura 23: programa de tratamiento para terapia de dosis repetida usando Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL (LOAd703) al nivel de dosis 5×10^{11} VP. Los recuadros azul y blanco representan 1 semana.

La invención se ilustra en los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Secuencias génicas de TMZ-CD154

Para ejemplificar la secuencia génica de una molécula TMZ-CD154 tal como se define en el presente documento, se han construido tales secuencias génicas de TMZ-CD154 para ser humano, caballo, perro y gato.

SEQ ID NO: 1 (ADN), SEQ ID NO: 2 (proteína)

Ser humano

CD154 trimerizado humano unido a membrana

1-9 secuencia de Kozak

10-108 cremallera de isoleucina

109-126 ligador

127-198 dominio transmembrana CD154 humano

199-846 dominio extracelular CD154 humano

La secuencia de aminoácidos para los dominios tm y ec de CD154 se marca en gris

ES 2 744 479 T3

1 GCCACCATGA GAATGAAGCA GATCGAGGAC AAGATCGAGG AGATCCTGAG
M R M K Q I E D K I E E I L S Marco 1

51 CAAGATCTAC CACATCGAGA ACGAGATCGC CAGAATCAAG AAGCTGATCG
K I Y H I E N E I A R I K K L I G Marco 1

101 GCGAGAGAGG CGGCCGGGGC GCGGCATTT TTATGTATTT ACTTACTGTT
E R G G R G G G I F M Y L L T V Marco 1

151 TTTCTTATCA CCCAGATGAT TGGGTCAGCA CTTTTGCTG TGTATCTTCA
F L I T Q M I G S A L F A V Y L H Marco 1

201 TAGAAGTTG GACAAGATAG AAGATGAAAG GAATCTTCAT GAAGATTTTG
R R L D K I E D E R N L H E D F V Marco 1

251 TATTCATGAA AACGATACAG AGATGCAACA CAGGAGAAAG ATCCTTATCC
F M K T I Q R C N T G E R S L S Marco 1

301 TTACTGAACT GTGAGGAGAT TAAAAGCCAG TTTGAAGGCT TTGTGAAGGA
L L N C E E I K S Q F E G F V K D Marco 1

351 TATAATGTTA AACAAAGAGG AGACGAAGAA AGAAAACAGC TTTGAAATGC
I M L N K E E T K K E N S F E M Q Marco 1

401 AAAAAGGTGA TCAGAATCCT CAAATGCGG CACATGTCAT AAGTGAGGCC
K G D Q N P Q I A A H V I S E A Marco 1

451 AGCAGTAAAA CAACATCTGT GTTACAGTGG GCTGAAAAAG GATACTACAC
S S K T T S V L Q W A E K G Y Y T Marco 1

501 CATGAGCAAC AACTTGGTAA CCCTGAAAA TGGGAAACAG CTGACCGTTA
M S N N L V T L E N G K Q L T V K Marco 1

551 AAAGACAAGG ACTCTATTAT ATCTATGCC AAGTCACCTT CTGTTCCAAT
R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S N Marco 1

601 CGGGAAGCTT CGAGTCAAGC TCCATTTATA GCCAGCCTCT GCCTAAAGTC
R E A S S Q A P F I A S L C L K S Marco 1

651 CCCCCGTAGA TTCGAGAGAA TCTTACTCAG AGCTGCAAAT ACCCACAGTT
P G R F E R I L L R A A N T H S S Marco 1

701 CCGCCAAACC TTGCGGGCAA CAATCCATTC ACTTGGGAGG AGTATTTGAA
A K P C G Q Q S I H L G G V F E Marco 1

751 TTGCAACCAG GTGCTTCGGT GTTTGTCAT GTGACTGATC CAAGCCAAGT
L Q P G A S V F V N V T D P S Q V Marco 1

801 GAGCCATGGC ACTGGCTTCA CGTCCTTTGG CTTACTCAAA CTCTGA
S H G T G F T S F G L L K L * Marco 1

SEQ ID NO: 3

5

TMZ-CD154 de caballo (dominio CD154 en negrita)

ES 2 744 479 T3

gccaccatgagaatgaagcagatcgaggacaagatcgagga-
gatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatcgccagaatcaagaagctgatcgg-
cgagagagggcggccggggcggcggcattttatgtatttgct-
tactgtttttctatcaccagatgattgtgtcagcacttttgctgt-
gtatcttcacagaagattggacaagatagaagatgaaaggaatcttcatgaagattttgt-
gttcatgaaaacgatacagagatgcaacaaaggaagggggcctttatcattactgaactgt-
gaggaaattagaagccagttcgaaggcttcgtcaaggatataatgctaaatgaagaagt-
gaagaagaagggagaaaactttgaaatgcaaaaaggcgatcaggagcctcaaatgagg-
cacatgtcataagtgaggccagcagtaaacagcatctgttctacagtgggcccataaag-
gatactacaccataagcaacaacttgtaacctcgaataagggaacagctggccgt-
taaaagacaaggactctat-
tatatctatgcccaagtcaccttctgttccaatcggaagcttcgggtcaagctccattta-
tagccagcctctgcctgaggtccgtgagtgatctgagagaatcttacttagagcgg-
caaatcccacagttcctcaaacttgccggcagcaatccattcacttgg-
gaggagtattgaattgcaaccaggtgcttcgggtttgtcaacgtgact-
gatccaagccaagttagccatgggaccggcttcacatcttttggttactcaactctga

Secuencia de aminoácidos de TMZ-CD154 de caballo

ATMRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGRRGGI
FMYLLTVFLITQMIVSALFAVYLHRRLDKIEDERNLHEDFVF
MKTIQRCNKGEGPLSLLNCEEIRSQFEGFVKDIMLNEEVKK
KGENFEMQKGDQEPQIAAHVISEASSKTASVLQWAQKGY
TISNNLVTLENGKQLAVKRQGLYIYAQVTFCSNREASGQA
PFIASLCLRSVSGSERILLRAANTHSSSKPCGQQSIHLGGVF
ELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

5

SEQ ID NO: 4

TMZ-CD154 de perro (dominio CD154 en negrita)

10

gccaccatgagaatgaagcagatcgaggacaagatcgagga-
gatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatcgccagaatcaagaagctgatcgg-
cgagagagggcggccggggcggcggcattttatgtatttgct-
tactgtttttctatcaccagatgattggatcggcacttttgctg-
tatacttcacagaagattggacaagatagaagatgaaaggaatctttatgaagattttgt-
gttcatgaaaacgttacagaaatgcaacaaaggggaggggtccttgccttactgaactgt-
gaggaaataaaagccaatttgaagcctttctcaaggaga-
taatgctaaacaacgaaatgaagaagaagaaaacattgcaatgcaaaaaggtgatcag-
gatcctcgaattgcagccatgtcataagtgaggctag-
tagtaaccagcgtccgttctgcgggtggcgccaaaagggactacacca-
taagcagcaacctggtgagcctcgagaatgggaaacagttggccgtgaaaa-
gacaaggactctattacgtctatgcccaagtcaccttctgctccaatcggg-
cagcttcgagtcaagctccgttcgtcgcagcctatgcctccattccccgagtggaacgga-
gagagtcttaccgcgccgagctcccggcgtcgtccaaacttgcgg-
ccaacagtcacatccacttgg-
gaggagtattgaattgcatccaggtgcttcgggtttcgtaacgtgact-
gatccaagccaagttagccacgggaccggcttcacgtcttttggttactcaactctgaa

Secuencia de aminoácidos de TMZ-CD154 de perro

ATMRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGRRGGGI
 FMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRRLDKIEDERNLYEDFVF
 MKTLQKCNKGEGLSLLNCEEIKSQFEAFLKEIMLNEMKK
 EENIAMQKGDQDPRIAAHVISEASSNPASVLRWAPKGYITI
 SSNLVSLNKGKQLAVKRQGLYYVYAQVTFCNRAASSQAP
 FVASLCLHSPSGTERVLLRAASSRGS SKPCGQQSIHLGGVF
 ELHPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

SEQ ID NO: 5

5 TMZ-CD154 de gato (dominio CD154 en negrita)

gccaccatgagaatgaagcagatcgaggacaagatcgagga-
 gatcctgagcaagatctaccacatcgagaacgagatcgccagaatcaagaagctgatcgg-
 cgagagaggcgccggggcgccgcatTTTTATGTATTACTTACTGT-
gTTTctatcaccagatgattgggctcagcactcttTgctgtgtatcttcaagaa-
gactggacaagatagaagatgaaaggaaatctttatgaagatttTg-
gTtcatgaaaacattacagaaatgcaacaaaggagagggggccttatccttactgaactgt-
gaggaaataaaagccggttgaagcctttcaaggaga-
taatgctaaacaaagaaacgaagaaagaaaaaaatgTtgcaatgcaaaaaggcgaccag-
gatcctcgagTtgcagcacatgtcataagtgaggccagcag-
tagcacagcgtctgttctccagTgggcccccaaaggctactacacca-
taagcagcaactTggtgaccctcgagaacgggaagcagctggccgttaaaa-
gacaaggactctat-
ta-
tatctacgcccagTcacttctgttccaatcggggaagcttgcagTcaagctccgttcatagccagcctctgcctg
cattccccgagTggatccgagagagTcttactca-
gagctgcaaatgcccgagTtctccaaccctgtgggcagcaatccattcactTgg-
gaggagTctcgaactgcatccaggtctcggtgttcgtgaacgtgact-
gatccgagccaagTgagccacgggacgggcttcacgtctttggcttactcaaactctgaa

10 Secuencia de aminoácidos de TMZ-CD154 de gato

ATMRMKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERGGRRGGGI
 FMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRRLDKIEDERNLYEDFVF
 MKTLQKCNKGEGLSLLNCEEIKSRFEAFLKEIMLNKETKK
 EKNVAMQKGDQDPRIAAHVISEASSNPASVLRWAPKGYITI
 SSNLVSLNKGKQLAVKRQGLYYVYAQVTFCNRAASSQAP
 FVASLCLHSPSGTERVLLRAANARSSSKPCGQQSIHLGGVF
 ELHPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL

Construcción de plásmidos

15 Se construyeron las secuencias génicas usando el software libre pDraw32 por AcaClone y luego se sintetizaron con un promotor de CMV por delante del gen 5' y las regiones flanqueantes de adenovirus (que también contienen los sitios de restricción 5'Sspl y 3'Scal) para la recombinación homóloga en vectores adenovirales en ambos extremos. Después de la región flanqueante 3' Ad, se sintetizó un sitio Poli A cuando se logró una expresión génica con la
 20 transfección de plásmidos. Se sintetizaron los fragmentos génicos y se subclonaron en un plásmido pUC57-Kan en GenScript Inc.

Construcción de vectores adenovirales

25 Se digirieron los plásmidos pUC57 con casetes transgénicos con enzimas Sspl y Scal y se aisló la banda mediante electroforesis en gel y purificación convencional. Se insertaron los casetes génicos en un plásmido del esqueleto

adenoviral mediante recombinación homóloga. Se expandieron las colonias con el inserto correcto y se confirmaron las secuencias génicas con análisis de patrones de restricción y secuenciación. Se transfectaron los adenoplásmidos con los casetes génicos en células 293 para generar los virus. Se realizaron ensayos en placa en células A549 para generar clones de virus únicos. Además, se amplificaron los virus en células A549 y se purificaron con centrifugación en gradiente con CsCl. Se formularon las partículas virales finales en TRIS 20 mM, NaCl 25 mM y glicerol al 2,5%. Se determinaron el título físico (O.D.) y el título funcional (tinción anti-hexón).

Líneas celulares

Se compraron las líneas celulares HEK 293, B16 y A549 de ATCC mientras que Karpas 422, PancO1, MiaPaCa2, PaCa3 y BxPC3 fueron un amable regalo del Instituto Karolinska. La línea celular MB49 fue un regalo del Hospital de la Universidad Nacional de Singapur. Se cultivaron las células 293 en medio basado en DMEM (FBS al 10%, estreptomycin de plagas al 1%, piruvato de sodio al 0,1%) de Life Technologies. Se hacen crecer A549 en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 GlutaMAX™ complementado con FBS al 10%, PeSt al 1%, HEPES al 1% y piruvato de sodio al 0,1%. Se hacen crecer MiaPaca2 y PanC01 en DMEM con FBS al 10% y PeSt al 1%. Se hacen crecer BxPC3 en medio RPMI 1640 GlutaMAX™ complementado con FBS al 1% y PeSt al 1%. Todos los componentes de los medios de crecimiento celular fueron de Life Technologies.

Preparación de la capa leucocitaria

Se compraron las capas leucocitarias del banco de sangre del Hospital de la Universidad de Uppsala. Se prepararon células mononucleares mediante centrifugación con Ficoll. De manera breve, se diluyó la capa leucocitaria 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió poco a poco a tubos Falcon de 50 ml que contenían 10 ml de Ficoll sin mezclar las dos fases. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 20 min sin romperse. Luego se transfirió la fase de glóbulos blancos pipeteándola a tubos nuevos y se lavó con centrifugación con PBS. Las células preparadas se usaron frescas o congeladas en tanques de nitrógeno líquido en medio de congelación que contenía DMSO para su futuro uso.

Preparación de células dendríticas inmaduras

Se clasificaron los monocitos CD14+ de células mononucleares de preparaciones de la capa leucocitaria usando el sistema de perlas MACS CD14 MicroBeads según el protocolo del fabricante (Miltenyi Biothec). Se congelaron las células CD14 (incluyendo las células T). Luego se diluyeron las células CD14+ en medio de cultivo RPMI (FBS al 10%, penicilina/estreptomycin al 1%) a una concentración de 1x10e6 células/ml. Se añadieron GM-CSF e IL-4 a una concentración final de 50 ng/ml y 25 ng/ml, respectivamente. Se añadió medio recién preparado con GM-CSF e IL-4 cada día durante una semana. Después de una semana de cultivo, se diferenciaron los monocitos en células dendríticas CD14-CD1a+ inmaduras.

Estimulación de células T

Se estimularon las células mononucleares de sangre periférica con anticuerpos OKT-3 (anti-CD3) (1 ug/ml) e IL2 (100 U/ml). En el día 3, se han expandido las células T y se transdujeron con vectores adenovirales tal como se describe a continuación, y se cultivaron las células con o sin IL2 recién preparado durante 48 h.

Transfección usando plásmidos

Se lavaron las células 293 con centrifugación con PBS (1500 rpm, 5 min). Se resuspendieron en medio las células (0,75x10e6/grupo) y se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante toda la noche. Al día siguiente, se mezclaron 5 ug de plásmido en una suspensión de 8 ul de polietilenimina en 100 ul de OptiMEM (Life Technologies) y se incubaron durante 20 min. Luego se hizo gotear la suspensión del plásmido en los pocillos con las células 293. Se cultivaron las células durante diferentes puntos de tiempo para el análisis FACS, recolección de sobrenadante y para cocultivos con células dendríticas. inmaduras

Transducción usando vectores adenovirales

Se lavaron en medio libre de suero las células que iban a transducirse con vectores adenovirales. Se añadieron 1x10e6 células por tubo cónico de 10 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el medio restante de aproximadamente 150 ul por tubo. Se añadieron adenovirus que oscilaban desde 25-100 ffu/célula a los tubos en los que después se incubaron durante 2 horas en un incubador de células a 37°C con el 5% de CO₂. Se añadió medio de cultivo celular con suero y se incubaron además las células y se usaron en los diferentes ensayos (citometría de flujo a diferentes puntos de tiempo, electroforesis en gel/inmunotransferencia de tipo Western, cocultivos con células dendríticas inmaduras, etc.).

Citometría de flujo

Se lavaron en PBS las células que iban a analizarse mediante citometría de flujo y se centrifugaron en tubos para

citometría de flujo (BD Biosciences). Se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron las células restantes mediante agitación con vórtex. Se añadieron anticuerpos o tetrámeros diluidos en albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en PBS a las suspensiones celulares y se incubaron 5 min a temperatura ambiente o 30 min a 4°C. Los anticuerpos que detectan CD154, CD83, HLA-DR, CD86, CD70, CD14, CD1a, CD3, CD8, CD107a y ligando 4-1BB humanos, así como Gr-1 y CD11b murinos, se compraron de BioLegend ya que, que el isotipo no correspondiera con los controles era irrelevante. Los tetrámeros pp65 de CMV se compraron de Nordic BioSite. Se lavaron las células teñidas con BSA al 1% en PBS y se fijaron usando paraformaldehído al 1% (PFA) en PBS en un volumen total de 300 ul/tubo. Se analizaron las células usando FACS Canto II de BD Biosciences. Se realizó el análisis de datos usando el software FlowJo de Treestar Inc.

Análisis de los sobrenadantes

Se analizaron los sobrenadantes de los cultivos celulares para la liberación de CD154 soluble humano, IL-12 humano, MCP1 de caballo y scFv para IL-6R humano de células sin transducir, transducidas o transfectadas. Se analizó sCD154 mediante ELISA usando el kit sCD40L Platinum de eBioScience Inc. Se analizó MCP1 de caballo usando de kit MCP1 de BioLegend. Se detectó IL-12p70 mediante un ELISA de elaboración propia. De manera breve, se recubrieron las placas de 96 pocillos con 1 ug/ml de anticuerpo anti-IL-12 humano (p70) purificado de Biologend durante la noche a 4°C. Se llevó a cabo el bloqueo añadiendo PBS con albúmina de suero bovino al 1% (BSA) (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37°C. Luego se incubaron las muestras en los pocillos recubiertos durante 2 h a 37°C después de que se añadiera un anticuerpo p40 anti-IL-12/IL-23 humano de biotina (Biolegend) a una concentración de 1 ug/ml durante 1 h a 37°C. Se diluyó peroxidasa de rábano conjugada con avidina (Dako A/S) a 1:4000 y se añadió a la placa durante 1 h a 37°C en oscuridad. Se llevó a cabo el desarrollo del ensayo usando TMB (Dako) y leyendo la absorbancia a 450 nm en el lector de microplacas de precisión a E_{máx} (Molecular Devices). Se analizó scFv para IL-6R humano mediante un ELISA de elaboración propia detectando el marcador Myk insertado en scFv. De manera breve, se recubrieron las placas con IL-6R humano recombinante y después se incubaron con muestras. Después del lavado con BSA-PBS al 1%, se incubaron las placas con un anticuerpo anti-myk-HRP que pudo detectarse después añadiendo sustrato y enzima peroxidasa (Dako). Se analizó el cambio de color mediante espectrofotometría. Además, se analizaron los sobrenadantes para múltiples citocinas usando Luminex de acuerdo con el protocolo de la empresa. Se usó un kit que detecta los siguientes analitos: IFNg, 1112, TNFa y IL21.

Electroforesis en gel e inmunotransferencia de tipo Western

Se prepararon lisados a partir de células transfectadas con plásmidos tal como se indicó anteriormente. Se lavaron las células una vez con PBS enfriado con hielo y se resuspendieron en tampón de lisis que contenía reactivo de extracción de proteínas de mamífero M-PER complementado con cóctel de inhibidor de fosfatasa Halt al 1% y cóctel de inhibidor de proteasa al 1% (Thermo Scientific). Se midió la concentración de proteínas de los lisados celulares mediante un kit de reactivo de ensayo de proteínas más Coomassie según el protocolo del fabricante. Se cargaron 10 ug de muestra en los geles de BioRad. Se mezclaron las muestras o bien en tampón de muestra que contenía mercaptoetanol (reducido) o no (no reducido). Las muestras reducidas también se llevaron a ebullición durante 5 min a 95°C antes de la carga. Se hizo correr el gel durante 50 min a 110 V, y luego se transfirió a una membrana usando pilas de transferencia de gel en una máquina iBlot (Life Technologies). Se bloquearon las membranas durante 1 h a temperatura ambiente (TA) y luego se añadió anticuerpo CD154 (H215) diluido 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc) a la membrana y se incubó durante la noche a 4°C. Se usó como un anticuerpo secundario HRP de cabra con antiIgG de conejo (Life Technologies) a una dilución de 1:2000 y se incubó durante 1 h a TA. Se desarrolló la membrana añadiendo la disolución ECL Clarity Western ECL Substrate (BioRad) y exponiéndola en el dispositivo V3 Western Workflow™ (BioRad).

Ensayo de viabilidad

Se determinó la capacidad oncolítica de los virus que contenían el transgén TMZ-CD154 usando el ensayo de proliferación celular de disolución acuosa CellTiter 96 (MTS) de Promega. Se usó el ensayo de acuerdo con el protocolo del fabricante. De manera breve, se transdujeron las células tumorales con los virus y luego se sembraron en placas de 96 pocillos en pocillos por cuadruplicado/grupo, 10.000 células/pocillo. Se obtuvieron células exocinas de donantes sanos del material sobrante de preparaciones de células del islote del Hospital Universitario de Uppsala y se usaron como control de la replicación restringida de células tumorales. Se cultivaron las placas y se analizaron a diferentes puntos de tiempo 24, 48 y 72 horas después de la transducción. Se añadieron 20 ul de reactivo de kit y se incubó la placa durante 1,5 horas. Se midió la absorbancia a A490 mediante espectrofotometría.

Activación y expansión de células T

Se transdujeron DC inmaduras de donantes positivos para CMV con los diferentes vectores virales de acuerdo con el protocolo para transducción viral, se dejaron sin transducir o se estimularon con TNFa (40 ng/ml) y poli IC (30 ug/ml). Al día siguiente, se recolectaron las células y se transfirieron a tubos y se lavaron mediante centrifugación con PBS (1500 rpm, 5 min). Se desecharon los sobrenadantes y se añadieron péptidos pp65 de CMV (10 ug) así como beta 2 microglobulina (1 ug) en los que después se incubaron las células a 37°C durante 4 horas. Se lavaron las células dos veces con PBS y luego se diluyeron en medio de cultivo hasta una concentración de 1x10e5

células/ml. De forma paralela, se descongelaron células mononucleares CD14 del mismo donante y se lavaron con centrifugación con PBS (1500 rpm, 5 min). Se diluyeron las células en medio de cultivo hasta una concentración de 1×10^6 células/ml. Se cocultivaron las DC inmaduras preparadas y las células mononucleares CD14 (incluyendo las células T) en una razón 1:10 en matraces T-25 (5-10 ml/matraz) durante 11 días. En el día 11, se analizaron las células T expandidas mediante citometría de flujo para determinar los marcadores de células T y la reactividad para tetrámeros pp65 de CMV.

Experimentos con animales

Se obtuvieron ratones hembra C57BL/6 de tipo natural o Nu/Nu de Taconic M&B. Se inyectaron células tumorales humanas Panc01 en ratones Nu/Nu inmunodeficientes. Sobre los tumores detectables, se inyectaron los tumores 1x con 1×10^9 VP de virus con TMZ-CD154 por ratón. Se midió el volumen del tumor a diferentes puntos de tiempo. Se inyectaron células tumorales murinas Panc02 en ratones de tipo natural. Se trataron los ratones dos veces a la semana con un adenovirus que portaba TMZ-CD154+4-1BBL murino (1×10^9 VP/ratón). Se administró gemcitabina (25 mg/kg) una vez a la semana. Se monitorizó el tamaño del tumor. Modelo ortotópico: se anestesiaron los ratones y se cateterizaron (INSYTE.w24Gx3/4; BD Biosciences). Se incubaron previamente las vejigas con 100 ul de poli-L-lisina 0,1 ug/ml (PLL, PM 70.000-150.000) (Sigma-Aldrich) para potenciar la adherencia de células tumorales. Luego se implantaron las células MB49 ($2,5 \times 10^5$ /ratón) en la vejiga. Los ratones recibieron un tratamiento intravesical local de Ad5-CD154 o Ad5 simulado murina de replicación defectuosa (1×10^8 ffu). Antes de la instilación vectorial, se lavaron previamente las vejigas tres veces con el potenciador de transducción Clorpactin WCS-90 (disolución al 0,1%) (United-Guardian) y un lavado con PBS. Para la determinación de la cantidad de células mieloides y células T dentro del tumor de la vejiga, 24 horas después del tratamiento, se tomaron los tumores, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y después se tiñeron y se evaluaron para determinar la presencia de células CD11b⁺Gr-1⁺ mediante inmunohistoquímica. Se alteró mecánicamente una parte del tumor para células únicas y se analizó mediante citometría de flujo para determina el número de células T infiltrantes. El modelo pmel: se hicieron crecer de manera subcutánea células tumorales B16 en ratones C57BL6. Se dividieron los ratones en cuatro grupos. El primer grupo recibió sólo PBS como control negativo. El segundo grupo se trató con AdCD40L, el tercer grupo con células T pmel y el cuarto grupo se trató primero con AdCD40L como cebador para terapia de células T pmel. El comité ético regional en Uppsala, Suecia, Dinamarca, aprobó todos los experimentos con animales: C86/10 y C54/13.

Inmunohistoquímica

Se fijaron secciones de 6 μ m de tejido ultracongelado embebidas en OCT (Tissue-Tek Sakura) en acetona enfriada con hielo (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos y se equilibraron en PBS. Se bloquearon los portaobjetos en suero de cabra normal al 10% (Dako) en PBS e IgG_{2b} de rata no específico (BD Biosciences, 5 μ g/ml) durante 2 horas antes de la incubación con anticuerpos primarios (2 μ g/ml, anti-CD11b murino de rata conjugado con PE (clon M1/70, BD Biosciences), anti-Gr-1 murino de rata conjugado con FITC (clon RB6-8C5, BD Biosciences) diluido en disolución de bloqueo durante 1 h a TA. Se contratiñeron los núcleos con 2 μ g/ml de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), seguido por lavado exhaustivo en PBS y la fijación con Fluoromount G (Southern Biotech). Se tomaron imágenes microscópicas que cubrían una sección del tumor entera por muestra en un microscopio Nikon Eclipse E100 equipado con una cámara Nikon DXM 1200 (Nikon Instruments Europe) usando un objetivo PlanApochromat 20x/0.75 (Nikon). Se analizaron las imágenes con ImageJ (NIH). Para determinar el número de células CD11b⁺Gr-1⁺, se definió el área positiva doble mediante umbrales manuales y se contaron los núcleos dentro de este área y la región de interés (ROI). Se expresó el número de células en relación a las ROI totales.

El modelo de bucle de sangre

Se hizo circular sangre completa en tubos heparinizados (2 ml/tubo). Se inyectaron los virus y después de 4 horas se tomaron las muestras de incubación para el análisis de activación complementaria y de citocinas. Se usaron muestras previas como control. Se inyectaron bucles de control con PBS o con el anticuerpo de activación anti-CD28.

Ejemplo 1

Transferencia y expresión del gen TMZ-CD154 usando un vehículo génico de plásmido

Para ejemplificar que un sistema de transferencia génica de plásmido puede usarse para transferir el gen TMZ-CD154 que conduce a la expresión de TMZ-CD154 en células transfectadas, se ha construido un vehículo génico de plásmido-TMZ-CD154 y se ha sometido a prueba su capacidad para administrar TMZ-CD154 a las células. El plásmido-TMZ-CD154 se construyó insertando el gen TMZ-CD154 humano en un plásmido de expresión pUC57-Kan tal como se describe en "Materiales y métodos". Luego se transfectó el plásmido (5 ug) en células 293 (1×10^6) y se determinó la expresión de TMZ-CD154 en las células transfectadas en el día 2 después de la transfección. En primer lugar, se lisó una proporción de las células mediante un tampón RIPA estándar y se analizó mediante electroforesis en gel e inmunotransferencia de tipo Western (figura 2A). Se dividieron en dos grupos cada una de las células 293 transfectadas o bien con TMZ-CD154 o bien con plásmidos simulados. Una de cada grupo no se llevó a ebullición en tampón de muestra reductor mientras que la otra se llevó a ebullición y contenía tampón de muestra

reductor. En este sentido, pudo identificarse TMZ-CD154 como monómero (reducido) u oligómeros (no reducido). Ambos grupos con células transfectadas simuladas fueron negativos para CD154. En los grupos de TMZ-CD154, pudo detectarse TMZ-CD154 monomérico tanto en el grupo reductor como en el grupo no reductor tal como se esperaba. Sin embargo, la cantidad fue menor que en el grupo reducido. Sólo en el grupo no reducido pudieron detectarse oligómeros de TMZ-CD154. De manera interesante, pudo detectarse CD154 de tipo natural en forma monomérica en ambos grupos, sugiriendo que la expresión de TMZ-CD154 también desencadena la expresión de CD154 de tipo natural. En segundo lugar, se analizaron las células restantes mediante citometría de flujo. La transfección de células 293 usando plásmido-TMZ-CD154 dio como resultado una expresión superficial celular robusta de TMZ-CD154 mientras que un plásmido de control simulado no dio como resultado la expresión de TMZ-CD154 (figura 2B). En tercer lugar, se analizaron mediante ELISA los sobrenadantes de células tumorales sin transducir o transducidas con virus que expresan TMZ-CD154, CD154 de tipo natural o sin transgenes (simulado) para determinar la liberación de CD154 en el medio. Los resultados demuestran que TMZ-CD154 no se libera en grandes cantidades en el sobrenadante celular en comparación con CD154 de tipo natural (figura 2C). CD154 normalmente conduce a la activación y proliferación de células T. TMZ-CD154 carece del dominio de señalización intracelular y para demostrar que TMZ-CD154 no provoca autoproliferación incontrolada en células T que expresan TMZ-CD154, se activaron las células T con OKT-3 e IL2 antes de la transducción con Ad5/35-TMZ-CD154, Ad5/35 simulado o se dejaron sin transducir. Se cultivaron las células con o sin IL2 durante 48 horas y se determinó el número de células. En la figura 2D se muestra que IL2 conduce a la expansión de las células T y que la adición de TMZ-CD154 no inducirá proliferación adicional. Las células T no proliferarán sin la adición de IL2 independientemente de la presencia de TMZ-CD154.

Ejemplo 2

Transferencia y expresión del gen TMZ-CD154 usando un vehículo génico viral

Para ejemplificar que un sistema de transferencia de vehículo génico viral puede usarse para transferir el gen TMZ-CD154 conduciendo a su expresión en células, se ha construido un vehículo génico basado en adenovirus (Ad5/35-TMZ-CD154). Se usó Ad5/35-TMZ-CD154 para transducir células 293 y después pudo detectarse de manera robusta la expresión del gen TMZ-CD154 en la superficie celular de estas células mientras que un virus de control simulado no pudo inducir la expresión de TMZ-CD154 (figura 3A).

Ejemplo 3

Transferencia y expresión del gen TMZ-CD154 en células tumorales

Para ejemplificar que puede diseñarse por ingeniería genética células tumorales para expresar TMZ-CD40L, se transfirió TMZ-CD154 a una línea celular tumoral derivada de cáncer de páncreas (Panc01) usando el vector Ad5/35-TMZ-CD154. La línea celular transducida expresó TMZ-CD154 tras la transducción con Ad5/35-TMZ-CD154 pero no con un vector de control simulado (figura 3B). Tal como se muestra previamente, pueden usarse de manera eficaz células tumorales que expresan CD154 como vacunas de células tumorales en modelos experimentales (Loskog A *et al.* JU 2001), y usarse para estimular la activación de DC y la expansión de células T *in vitro* (Loskog A *et al.* CGT 2002; Loskog *et al.* JI 2004; Loskog *et al.* CII 2006).

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia de destrucción celular del vector oncolítico Ad5/35-TMZ-CD154

Para ejemplificar que pueden lisarse células tumorales mediante un vector oncolítico Ad5/35-TMZ-CD154, se transdujeron células tumorales (A) Panc01, B) MiaPaCa2, C) BxPC3) y D) Karpas-422 con Ad5/35-TMZ-CD154 (MOI 100 ffu/célula). En el día 3, se analizó la viabilidad de las células en un ensayo de viabilidad celular descrito en "Métodos y materiales", y los resultados demostraron claramente que el vector oncolítico Ad5/35-TMZ-CD154 fue mejor para destruir células tumorales que usar un virus defectuoso en replicación o en comparación con células sin transducir (figura 4). El grupo competente en replicación de Ad5/35-TMZ-CD154 mostró citotoxicidad potenciada en comparación con el vector competente en replicación de Ad5/35 simulado correspondiente usando la línea celular Panc01, y las otras dos líneas celulares también mostraron esta citotoxicidad aumentada en grupos de TMZ-CD154 pero la diferencia no alcanzó significancia. El virus fue igualmente eficaz en la línea celular del linfoma Karpas-422.

Ejemplo 5

Transferencia y expresión del gen TMZ-CD154 en células dendríticas

Para ejemplificar que pueden activarse células que presentan antígenos tales como células dendríticas por TMZ-CD154, se realizaron estudios de activación en células humanas. Se clasificaron los monocitos de células mononucleares de sangre periférica preparadas a partir de capas leucocitarias tal como se describe en "Métodos y materiales" usando perlas MACS CD14. Luego se cultivaron los monocitos durante siete días con IL-4 y GM-CSF para diferenciarlos en células dendríticas inmaduras. Luego se cocultivaron las células dendríticas inmaduras con

células 293 transfectadas con el plásmido-TMZ-CD154 o control simulado. Después de 2 días, se recolectaron las células y los sobrenadantes y se analizaron para determinar el estado de activación de las células dendríticas mediante citometría de flujo (marcador de activación de CD83) y ELISA (marcador de activación de IL-12). Los resultados demostraron que las células dendríticas sometidas a estimulación con TMZ-CD154 maduraron en un fenotipo activado que aumentó la expresión de CD83 y produjo niveles altos de IL-12 (figura 5A, B). Los resultados también demostraron que CD154 unido a membrana incluyendo TMZ-CD154 induce un alto grado de activación de las células dendríticas dado que las células dendríticas estimuladas con TMZ-CD154 expresan una cantidad significativamente mayor de IL-12 que las formas soluble trimerizada (stCD40L) o multimérica de CD154 (sCD40L multímero).

Ejemplo 6

Transducción de células dendríticas con Ad5/35-TMZ-CD154

A. Para ejemplificar que pueden transducirse células que presentan antígenos, tales como células dendríticas, con el vector Ad5/35-TMZ-CD154, se transdujeron células dendríticas inmaduras con este vector o control simulado. Los resultados demostraron que las células dendríticas transducidas con Ad5/35-TMZ-CD154 maduraron en células dendríticas activadas que expresan CD83 que producen IL-12 (figura 6A, B). Las DC activadas por Ad5/35-TMZ-CD154 tuvieron también expresión aumentada de HLA-DR, CD86 y CD70 (figura 6A).

B. Para ejemplificar que células que presentan antígenos, tales como células dendríticas, activadas por TMZ-CD154 puede inducir respuestas de células T específicas de antígenos, tales como células T específicas de CMV anti-virales, se cultivaron células dendríticas transducidas con Ad5/35-TMZ-CD154 o control simulado con péptidos pp65 de CMV y se cocultivaron con células T autólogas tal como se describe en "Métodos y materiales". Después de una expansión de 11 días, se determinó el nivel de células T específicas de pp65 mediante tinción de tetrámeros y citometría de flujo. Los resultados muestran que las células dendríticas activadas con TMZ-CD154 pudieron activar y expandir células T específicas de pp65 (figura 7).

Ejemplo 7

Se ha observado previamente que el adenovirus que expresa CD154 humano puede inducir la activación de células inmunitarias derivadas de perro (von Euler *et al.* JIT 2008), y las CMSP de caballo también muestran la activación tras adenovirus que expresa CD154 dado que la población de linfocitos expande la transducción después del virus de las CMSP (véase "Métodos y materiales") (figura 8A). Además, MCP-1 está aumentado en los sobrenadantes de las CMSP transducidas (figura 8B).

Ejemplo 8

Control del crecimiento del tumor in vivo

Para ejemplificar que Ad5/35-TMZ-CD154 puede controlar el crecimiento del tumor *in vivo*, se trataron ratones con tumores Panc01 de xenoinjerto humano 1x con Ad5/35-TMZ-CD154 o PBS. En el día 7, se midió el volumen del tumor. Los resultados demuestran que Ad5/35-TMZ-CD154 puede inhibir la progresión del tumor *in vivo* debido a la capacidad oncolítica del virus (figura 9). Los efectos inmunológicos del virus no pueden evaluarse en modelos murinos dado que TMZ-CD154 humano no reacciona de manera cruzada con CD40 murino. Además, el virus no se replica en tumores murinos, por tanto, debe usarse modelos de xenoinjerto humano en ratones inmunodeficientes.

Ejemplo 9

Combinación de TMZ-CD154 con otros inmunomoduladores en sistemas vectoriales

Para ejemplificar que TMZ-CD154 puede combinarse con otros moduladores inmunitarios, se diseñó por ingeniería genética el constructo del gen TMZ-CD154 junto con o bien el gen del ligando 4-1BB o un gen para un scFv anti-IL6R en sistemas de plásmido y vector adenoviral.

SEQ ID NO: 6 (ADN), SEQ ID NO: 7 (proteína)

Gen TMZ-CD154/4-1BBL

1-6: secuencia de Kozak

7-768: 4-1BBL

769-831: péptido T2A

832-1668: TMZ-CD154

ES 2 744 479 T3

1 GCCACCATGG AATACGCCTC TGACGCTTCA CTGGACCCCG AAGCCCCGTG
 M E Y A S D A S L D P E A P W **Marco 1**

51 GCCTCCCGCG CCCCgcgctc GCGCCTGCCG CGTACTGCCT TGGGCCCTGG
 P P A P R A R A C R V L P W A L V **Marco 1**

101 TCGCGGGGCT GCTGCTGCTG CTGCTGCTCG CTGCCGCCTG CGCCGTCTTC
 A G L L L L L L L L A A A C A V F **Marco 1**

151 CTCGCCTGCC CCTGGGCCGT GTCCGGGGCT CGCGCCTCGC CCGGCTCCGC
 L A C P W A V S G A R A S P G S A **Marco 1**

201 GGCCAGCCCG AGACTCCCGG AGGGTCCCGA GCTTTCGCC GACGATCCCG
 A S P R L R E G P E L S P D D P A **Marco 1**

251 CCGGCCTCTT GGACCTGCGG CAGGGCATGT TTGCGCAGCT GGTGGCCCAA
 G L L D L R Q G M F A Q L V A Q **Marco 1**

301 AATGTTCTGC TGATCGATGG GCCCTGAGC TGGTACAGTG ACCCAGGCCT
 N V L L I D G P L S W Y S D P G L **Marco 1**

351 GGCAGGCGTG TCCCTGACGG GGGGcctigag CIACAAAGAG GACACGAAGG
 A G V S L T G G L S Y K E D T K E **Marco 1**

401 AGCTGGTGGT GGCCAAGGCT GGAGTCTACT ATGTCTTCTT TCAACTAGAG
 L V V A K A G V Y Y V F F Q L E **Marco 1**

451 CTGCGGCGCG TGGTGGCCGG CGAGGGCTCA GGCTCCGTTT CACTTGCCT
 L R R V V A G E G S G S V S L A L **Marco 1**

501 GCACCTGCAG CCACTGCGCT CTGCTGCTGG GGCCGCCGCC CTGGCTTTGA
 H L Q P L R S A A G A A A L A L T **Marco 1**

ES 2 744 479 T3

551	CCGTGGACCT	GCCACCCGCC	TCCTCCGAGG	CTCGGAACTC	GGCCTTCGGT	
	V D L	P P A	S S E A	R N S	A F G	Marco 1
601	TTCCAGGGCC	GCTTGCTGCA	CCTGAGTGCC	GGCCAGCGCC	TGGGCGTCCA	
	F Q G R	L L H	L S A	G Q R L	G V H	Marco 1
651	TCTTCACACT	GAGGCCAGGG	CACGCCATGC	CTGGCAGCTT	ACCCAGGGCG	
	L H T	E A R A	R H A	W Q L	T Q G A	Marco 1
701	CCACAGTCTT	GGGACTCTTC	CGGGTGACCC	CCGAAATCCC	AGCCGGACTC	
	T V L	G L F	R V T P	E I P	A G L	Marco 1
751	CCTTCACCGA	GGTCGGAAGG	CTCCGGGGAG	GGCAGAGGAA	GTCTGCTAAC	
	P S P R	S E G	S G E	G R G S	L L T	Marco 1
801	ATGCGGTGAC	GTCGAGGAGA	ATCCTGGGCC	CAGAATGAAG	CAGATCGAGG	
	C G D	V E E N	P G P	R M K	Q I E D	Marco 1
851	ACAAGATCGA	GGAGATCCTG	AGCAAGATCT	ACCACATCGA	GAACGAGATC	
	K I E	E I L	S K I Y	H I E	N E I	Marco 1
901	GCCAGAATCA	AGAAGCTGAT	CGGCAGAGAGA	GGCGGCCGGG	GCGGCGGCAT	
	A R I K	K L I	G E R	G G R G	G G I	Marco 1
951	TTTTATGTAT	TTACTTACTG	TTTTCTTAT	CACCCAGATG	ATTGGGTCAG	
	F M Y	L L T V	F L I	T Q M	I G S A	Marco 1
1001	CACTTTTTGC	TGTGTATCTT	CATAGAAGGT	TGGACAAGAT	AGAAGATGAA	
	L F A	V Y L	H R R L	D K I	E D E	Marco 1
1051	AGGAATCTTC	ATGAAGATTT	TGTATTCATG	AAAACGATAC	AGAGATGCAA	
	R N L H	E D F	V F M	K T I Q	R C N	Marco 1
1101	CACAGGAGAA	AGATCCTTAT	CCTTACTGAA	CTGTGAGGAG	ATTA AAAAGCC	
	T G E	R S L S	L L N	C E E	I K S Q	Marco 1
1151	AGTTTGAAGG	CTTTGTGAAG	GATATAATGT	TAAACAAAGA	GGAGACGAAG	
	F E G	F V K	D I M L	N K E	E T K	Marco 1
1201	AAAGAAAACA	GCTTTGAAAT	GCAAAAAGGT	GATCAGAATC	CTCAAATTGC	
	K E N S	F E M	Q K G	D Q N P	Q I A	Marco 1
1251	GGCACATGTC	ATAAGTGAGG	CCAGCAGTAA	AACAACATCT	GTGTTACAGT	
	A H V	I S E A	S S K	T T S	V L Q W	Marco 1
1301	GGGCTGAAAA	AGGATACTAC	ACCATGAGCA	ACA ACTTGGT	AACCCTGGAA	
	A E K	G Y Y	T M S N	N L V	T L E	Marco 1
1351	AATGGGAAAC	AGCTGACCGT	TAAAAGACAA	GGACTCTATT	ATATCTATGC	
	N G K Q	L T V	K R Q	G L Y Y	I Y A	Marco 1
1401	CCAAGTCACC	TTCTGTTCCA	ATCGGGAAGC	TTCGAGTCAA	GCTCCATTTA	
	Q V T	F C S N	R E A	S S Q	A P F I	Marco 1
1451	TAGCCAGCCT	CTGCCTAAAG	TCCCCGGTA	GATTCGAGAG	AATCTTACTC	
	A S L	C L K	S P G R	F E R	I L L	Marco 1
1501	AGAGCTGCAA	ATACCCACAG	TTCCGCCAAA	CCTTGCGGGC	AACAATCCAT	
	R A A N	T H S	S A K	P C G Q	Q S I	Marco 1
1551	TCACTTGGGA	GGAGTATTTG	AATTGCAACC	AGGTGCTTCG	GTGTTTGTC A	
	H L G	G V F E	L Q P	G A S	V F V N	Marco 1
1601	ATGTGACTGA	TCCAAGCCAA	GTGAGCCATG	GCACTGGCTT	CACGTCCTTT	
	V T D	P S Q	V S H G	T G F	T S F	Marco 1
1651	GGCTTACTCA	AACTCTGA				
	G L L K	L *				Marco 1

ES 2 744 479 T3

SEQ ID NO: 8 (ADN), SEQ ID NO: 9 (proteína)

Gen de TMZ-CD154/ scFv aIL6R

5

1-6: secuencia de Kozak

7-59: SigPep

10

60-798: scFv aIL6R

799-861: péptido T2A

15

862-1698: TMZ-CD154

1	GCCACCATGC ACAGCTCAGC ACTGCTCTGT TGCCTGGTCC TCCTGACTGG	
	M H S S A L L C C L V L L T G	Marco 1
51	GGTGAGGGCC CAGGTCCAAC TGCAGGAGAG CGGTCCAGGT CTTGTGAGAC	
	V R A Q V Q L Q E S G P G L V R P	Marco 1
101	CTAGCCAGAC CCTGAGCCTG ACCTGCACCG TGTCTGGCTA CTCAATTACC	
	S Q T L S L T C T V S G Y S I T	Marco 1
151	AGCGATCATG CCTGGAGCTG GGTTCGCCAG CCACCTGGAC GAGGTCTTGA	
	S D H A W S W V R Q P P G R G L E	Marco 1
201	GTGGATTGGA TACATTAGTT ATAGTGAAT CACAACCTAT AATCCATCTC	
	W I G Y I S Y S G I T T Y N P S L	Marco 1
251	TCAAATCCAG AGTGACAATG CTGAGAGACA CCAGCAAGAA CCAGTTCAGC	
	K S R V T M L R D T S K N Q F S	Marco 1
301	CTGAGACTCA GCAGCGTGAC AGCCGCCGAC ACCGCGGTTT ATTATTGTGC	
	L R L S S V T A A D T A V Y Y C A	Marco 1
351	AAGATCCCTA GCTCGGACTA CGGCTATGGA CTACTGGGGT CAAGGCAGCC	
	R S L A R T T A M D Y W G Q G S L	Marco 1
401	TCGTCACAGT CTCCTCAGGT GCGGTGGCT CGGGTGGCGG TGGCTCGGGC	
	V T V S S G G G G S G G G G S G	Marco 1
451	GGTGGTGGGT CGGGTGGCGG CGGATCAGAC ATCCAGATGA CCCAGAGCCC	
	G G G S G G G G S D I Q M T Q S P	Marco 1
501	AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG TGGGTGACAG GGTGACCATC ACCTGTCGAG	
	S S L S A S V G D R V T I T C R A	Marco 1
551	CCAGCCAGGA CATCAGCAGT TACCTGAATT GGTACCAGCA GAAGCCAGGA	
	S Q D I S S Y L N W Y Q Q K P G	Marco 1
601	AAGGCTCCAA AGCTGCTGAT CTACTIONACC TCCCGCTGC ACTCTGGTGT	
	K A P K L L I Y Y T S R L H S G V	Marco 1
651	GCCAAGCAGA TTCAGCGGTA GCGGTAGCGG TACCGACTTC ACCTTCACCA	
	P S R F S G S G S G T D F T F T I	Marco 1
701	TCAGCAGCCT CCAGCCAGAG GACATCGCTA CCTACTACTG CCAGCAGGGT	
	S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q G	Marco 1
751	AACACGCTTC CATAACGTT CGGCCAAGGG ACCAAGGTGG AAATCAAAGG	
	N T L P Y T F G Q G T K V E I K G	Marco 1

ES 2 744 479 T3

801	CTCCGGGGAG GGCAGAGGAA GTCTGCTAAC ATGCGGTGAC GTCGAGGAGA S G E G R G S L L T C G D V E E N	Marco 1
851	ATCCTGGGCC CAGAATGAAG CAGATCGAGG ACAAGATCGA GGAGATCCTG P G P R M K Q I E D K I E E I L	Marco 1
901	AGCAAGATCT ACCACATCGA GAACGAGATC GCCAGAAATCA AGAAGCTGAT S K I Y H I E N E I A R I K K L I	Marco 1
951	CGGCGAGAGA GGCGCCGGG GCGGCGGCAT TTTTATGTAT TTACTIONTCTG G E R G G R G G G I F M Y L L T V	Marco 1
1001	TTTTCTTAT CACCCAGATG ATTGGGTCAG CACTTTTTGC TGTGTATCTT F L I T Q M I G S A L F A V Y L	Marco 1
1051	CATAGAAGGT TGGACAAGAT AGAAGATGAA AGGAATCTTC ATGAAGATTT H R R L D K I E D E R N L H E D F	Marco 1
1101	TGTATTCATG AAAACGATAC AGAGATGCAA CACAGGAGAA AGATCCTTAT V F M K T I Q R C N T G E R S L S	Marco 1
1151	CCTTACTGAA CTGTGAGGAG ATTTAAAGCC AGTTTGAAGG CTTTGTGAAG L L N C E E I K S Q F E G F V K	Marco 1
1201	GATATAATGT TAAACAAAGA GGAGACGAAG AAAGAAAACA GCTTTGAAAT D I M L N K E E T K K E N S F E M	Marco 1
1251	GCAAAAAGGT GATCAGAATC CTCAAATTGC GGCACATGTC ATAAGTGAGG Q K G D Q N P Q I A A H V I S E A	Marco 1
1301	CCAGCAGTAA AACAAATCT GTGTTACAGT GGGCTGAAAA AGGATACTAC S S K T T S V L Q W A E K G Y Y	Marco 1
1351	ACCATGAGCA ACAACTTGGT AACCTGGAA AATGGGAAAC AGCTGACCGT T M S N N L V T L E N G K Q L T V	Marco 1
1401	TAAAAGACAA GGACTCTATT ATATCTATGC CCAAGTCACC TTCTGTCCA K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S N	Marco 1
1451	ATCGGGAAGC TTCGAGTCAA GCTCCATTTA TAGCCAGCCT CTGCCTAAAG R E A S S Q A P F I A S L C L K	Marco 1
1501	TCCCCGGTA GATTGAGAG AATCTTACTC AGAGCTGCAA ATACCCACAG S P G R F E R I L L R A A N T H S	Marco 1
1551	TTCCGCCAAA CCTTGGGGC AACAAATCCAT TCACTTGGGA GGAGTATTTG S A K P C G Q Q S I H L G G V F E	Marco 1
1601	AATTGCAACC AGGTGCTTCG GTGTTTGTC AATGTGACTGA TCCAAGCCAA L Q P G A S V F V N V T D P S Q	Marco 1
1651	GTGAGCCATG GCACTGGCTT CACGTCCTTT GGCTTACTCA AACTCTGA V S H G T G F T S F G L L K L *	Marco 1

Ejemplo 10

5 Expresión de genes *TMZ-CD154/4-1BBL/ scFv aIL6R* en células

10 A. Para ejemplificar que el plásmido-TMZ-CD154/4-1BBL y el plásmido- scFv aIL6R pueden usarse para transferir los genes TMZ-CD154/4-1BBL/ scFv aIL6R e inducir la expresión de éstos en células, se usaron plásmido- TMZ-CD154/4-1BBL y plásmido- scFv aIL6R para transfectar células 293. Los resultados demuestran que todos los transgenes pueden expresarse tras la transfección con estos plásmidos (figura 10). Véase "Métodos y materiales".

B. Para ejemplificar que TMZ-CD154 puede expresarse en posición *trans* con otro gen separado por un péptido 2A, se usó Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL para transducir células dendríticas. Los resultados demuestran que ambos transgenes pueden expresarse tras la transducción con estos vectores virales (figura 11). Véase "Métodos y

materiales”.

Ejemplo 11

5 *Activación de células dendríticas combinando TMZ-CD154 con ligando 4-1BB o scFv aLL6R*

Para ejemplificar que la combinación de TMZ-CD154 y ligando 4-1BB puede activar células que presentan antígenos tales como células dendríticas, se transdujeron células dendríticas inmaduras con vectores Ad5/35-TMZ-CD154, Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BB o Ad5/35-TMZ-CD154/ scFv aLL6R, con un vector simulado o se dejaron sin transducir. Los resultados demuestran que las células dendríticas transducidas maduraron y se activaron tras la expresión de los transgenes tal como se muestra mediante su expresión de CD83 (figura 12). Además, estos virus de combinación dieron como resultado la regulación por incremento de CD70 en las células dendríticas en comparación con TMZ-CD154 solo incluso si el virus que contenía TMZ-CD154 dio como resultado la expresión de CD70 mayor que si las células dendríticas se estimularan con un virus simulado vacío (figura 13). Además, las células dendríticas transducidas expresaron niveles mayores de IFN γ e IL12 en el grupo Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BB (figura 14). Véase “Métodos y materiales”.

Ejemplo 12

20 *Activación de células T específicas de antígenos*

Para ejemplificar que las células dendríticas estimuladas por o bien la combinación de TMZ-CD154/4-1BB o bien la combinación de TMZ-CD154/aLL6R pueden activar células T específicas de antígenos, se cocultivaron las células dendríticas pulsadas con péptidos pp65 de CMV transducidos con o bien el vector Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BB o bien el vector Ad5/35-TMZ-CD154/ scFv aLL6R con células T autólogas. Después de una expansión de 11 días, se determinó el número de células T específicas de pp65 activadas. Los resultados muestran que las células dendríticas estimuladas con o bien Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BB o bien Ad5/35-TMZ-CD154/ scFv aLL6R pueden activar y expandir células T específicas de antígenos en comparación con el número de células T específicas de antígeno en las células mononucleares de un determinado donante (figura 15A). Las células dendríticas transducidas con virus que contenían tanto TMZ-CD154 como ligando 4-1BB o scFv aLL6R indujeron un mayor número de células después de la expansión que las células dendríticas transducidas con virus que contenían TMZ-CD154 solo (figura 15B). El virus tanto con TMZ-CD154 como con ligando 4-1BB expandió también linfocitos citotóxicos naturales en los cultivos (figura 15C). Véase “Métodos y materiales”.

35 Ejemplo 13

TMZ-CD154 combinado con otros tratamientos

Para ejemplificar que TMZ-CD154 puede combinarse con otras terapias, se trataron las células tumorales con Ad5/35-TMZ-CD154, Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BB o Ad5/35-TMZ-CD154/aLL6R solo y en combinación con gemcitabina (100 μ M). Los resultados demuestran que Ad5/35-TMZ-CD154 puede combinarse con otros tratamientos sin perder su capacidad para destruir células cancerosas y que la combinación con otros tratamientos aumenta la muerte de células tumorales (figura 16A). Se hicieron crecer células tumorales pancreáticas murinas Panc02 en ratones C57BL6 y se trataron con un adenovirus oncolítico que portaba TMZ-CD154+4-1BB dos veces a la semana 6x +/- semanalmente (3 veces) con gemcitabina (25 mg/kg). Se evaluó el crecimiento del tumor con el tiempo. C) Se transdujeron células pancreáticas humanas Panc01 tal como en (A) anteriormente y se cultivaron con o sin paclitaxel (2 μ M). * indica diferencias de $p < 0,05$. Véase “Métodos y materiales”.

Ejemplo 14

El TMZ-CD154 humano no puede activar CD40 murino. Se insertó por tanto una CD154 murina en un vector Ad5 para demostrar que puede usarse la activación inmunitaria mediada por Ad-CD154 *in vivo* para sensibilizar previamente el tumor a la terapia de células T reduciendo la presencia de células supresoras derivadas de mieloides que permite la infiltración y supervivencia de células T en el entorno tumoral. Los resultados muestran que tumores tratados con Ad-CD154 redujeron el número de células supresoras derivadas de mieloides (figura 17A) y aumentaron su capacidad para atraer y activar células T infiltrantes de tumor (figura 17B). Véase “Métodos y materiales”. De hecho, TMZ-CD154 puede, solo o junto con 4-1BB, regular por incremento E-selectina e ICAM-I en la superficie de células endoteliales. E-selectina e ICAM-I son importantes para captar linfocitos mediante la fijación y diapédesis aumentadas (figura 18).

Ejemplo 15 - resumen de datos preclínicos en relación a LOAd703

Capacidad oncolítica

Se ha evaluado la capacidad de LOAd703 para inducir la oncólisis de células tumorales en un panel de líneas celulares de cáncer de páncreas. Todas las líneas celulares transducidas con LOAd703 expresaron los transgenes

TMZ-CD40L y 4-1BBL y se observó una muerte celular dependiente de la dosis con el tiempo. Las células murieron principalmente de apoptosis tal como se muestra detectando anexina V mediante citometría de flujo. Sin embargo, las células inmunitarias de donante sanas tales como DC, células T o linfocitos citolíticos naturales no murieron de oncólisis mediada por LOAd703 incluso si se detectó la expresión del transgén (DC, células T). Además, LOAd703 no se replicó en células pancreáticas exocrinas normales demostrando la replicación regulada de este OV (figura 19). La replicación de LOAd703 no está restringida a células de cáncer de páncreas, otros tumores pueden seleccionarse como diana así de igual manera ya que la mayoría de los tumores tienen una ruta Rb desregulada. Por tanto, LOAd703 pudo inducir de manera eficaz la oncólisis de otras líneas celulares de tumor derivado de linfoma de células B o adenocarcinoma de pulmón. Además, la muerte de células tumorales debido a la oncólisis mediada por LOAd703 puede potenciarse con agentes quimioterapéuticos tales como gemcitabina o paclitaxel comúnmente usados para pacientes con cáncer de páncreas (figura 16).

Se usó LOAd703 como inyecciones peritumorales de dosis única o múltiple (hasta 6 veces) en ratones xenoinjertados con tumores establecidos de cáncer de páncreas subcutáneos humanos. LOAd703 pudo inducir la regresión del tumor dependiente simplemente de la oncólisis dado que los modelos de xenoinjerto utilizan ratones inmunodeficientes. En modelos agresivos (tumores grandes), la gemcitabina puede aumentar de manera significativa la eficacia de LOAd703. Estos datos proporcionan un fundamento de que debe usarse LOAd703 en combinación con gemcitabina de tratamiento habitual para pacientes con cáncer de páncreas (figura 16).

Efecto inmunoestimulador

La transducción de LOAd703 de células dendríticas derivadas de monocitos humanos indujo su maduración tal como se muestra mediante la expresión de la regulación por incremento de los marcadores de superficie celular tales como CD83 y CD70 (figuras 12 y 13). Las DC maduras también expresaron y liberaron las citocinas IL12, TNF α , IL21 e IFN γ que promueven Th1 (figura 14). En cambio, las DC activadas pudieron inducir respuestas de células T específicas e inducir la expansión de tanto células T como linfocitos citolíticos naturales (figura 15). Por tanto, LOAd703 puede inducir potencialmente la inmunidad mediada por Th1 contra células tumorales. Se demostraron las respuestas inmediatas para LOAd703 en sangre completa en un modelo de bucle de sangre de donante sano en el que el virus se añade a sangre completa circulante *in vitro*. Los resultados demuestran que el virus de serotipo 5/35 LOAd703 no indujo la activación complementaria o la liberación de citocinas inmediata, y fue comparable con un virus de adenoserotipo 5 que codifica para CD40L que se ha usado en pacientes (figura 20).

Desafortunadamente, LOAd703 no puede investigarse para determinar su efecto inmunoestimulador en modelos animales porque las células murinas carecen de CD46, el receptor para la captación viral. Incluso si la transducción *in vitro* puede llevarse a cabo con una razón de virus con respecto a célula alta, es difícil alcanzar la dosis alta de virus por célula necesaria para la transducción eficaz *in vivo*. Sin embargo, se usó una versión murina de LOAd703 (mLOAd703) que expresa TMZ-CD40L y 4-1BBL murinos en un modelo murino de cáncer de páncreas. Se transdujeron las células tumorales murinas *in vitro* y para expresar los dos transgenes murinos TMZ-CD40L y 4-1BBL. Luego se inyectaron las células tumorales transducidas en ratones y se monitorizaron los ratones para determinar el crecimiento del tumor. Las células tumorales CD40L+4-1 BBL+ activaron la inmunidad antitumoral y formaron tumores. Los tumores de control que carecen de CD40L y 4-1BBL formaron tumores en 14 días.

Dado que las células endoteliales expresan CD40, pueden reaccionar para la señalización de CD40L. En un modelo que usa células endoteliales humanas (HUVEC), se ha demostrado que las células HUVEC regulan por incremento receptores para la fijación de células T, el rodamiento y la diapédesis tras la transducción de LOAd703 (figura 18). Por tanto, LOAd703 puede potenciar la infiltración de células T en el parénquima tumoral previniéndose así la localización de linfocitos infiltrantes de tumor al estroma, un problema común para la actividad de células T específicas de tumor. LOAd703 no transduce células murinas *in vivo* dado que las células murinas carecen de CD46 tal como se indicó anteriormente. Los adenovirus de serotipo 5 son mejores para transducir células murinas. Por tanto, se usó un virus Ad5 que portaba CD40L murino para demostrar que las células HUVEC expresaban los receptores cruciales para la fijación de células T, el rodamiento y la diapédesis tras la transducción, y que la transferencia génica al tumor *in vivo* de hecho induce una infiltración masiva de células T activadas mostrando que LOAd703 también puede usarse de manera eficaz para cebar tumores antes de la terapia de células T (figura 21).

Sumario de datos de toxicidad in vivo

La eficacia completa, y posible toxicidad, de virus oncolíticos basados en adenovirus dotados con genes inmunoestimuladores humanos es difícil de estimar usando modelos animales. En primer lugar, los adenovirus no se replican suficientemente en células murinas. Por tanto, la oncólisis necesita determinarse en modelos de xenoinjerto usando células tumorales humanas en ratones inmunodeficientes. La toxicidad fuera de la diana, por ejemplo la propagación del virus que conduce a la transducción y posible oncólisis de células sanas no puede determinarse en ratones. Sin embargo, los datos *in vitro* mostraron que LOAd703 no se replicaba en células normales incluyendo células pancreáticas exocrinas. La toxicidad debido a la expresión del transgén también se dificulta dado que CD40L humano no es reactivo en células murinas. Además, dado que las células tumorales murinas no expresan CD46, la transducción del virus se restringe a situaciones *in vitro* en las que las pueden aumentarse las partículas virales por célula para eludir la necesidad de CD46. Se inyectaron por tanto de manera subcutánea las células de cáncer de

páncreas murino transducidas *in vitro* que expresan TMZ-CD40L y 4-1BBL murinos en ratones para determinar la posible toxicidad de la expresión del transgén. No se observaron reacciones adversas tras inyecciones repetidas (3x).

- 5 Se inyectó también LOAd703 repetidamente (4 veces) en hámsteres sirios que portan tumores. Los adenovirus muestran alguna actividad oncolítica en hámsteres sirios, sin embargo, los transgenes humanos no funcionan de manera óptima y hay pocas herramientas para medir reacciones inmunitarias antitumorales bien definidas en el hámster. Sin embargo, no se observaron reacciones adversas en los hámsteres tratados.

10 **Ejemplo 16 – prueba de concepto para TMZ-CD154+4-1BBL (LOAd703)**

Se ha desarrollado un protocolo para un ensayo clínico para obtener una prueba de concepto para la eficacia de TMZ-CD154+4-1BBL. Se ha producido el virus oncolítico Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL en condiciones de BPF y se usará como una especialidad farmacéutica de investigación para tratar pacientes con cáncer de páncreas diagnosticado con 1-3 metástasis empezando su primer tratamiento con gemcitabina de tratamiento habitual. Se administró el virus (500 µl) mediante inyección intratumoral guiada por imagen en este estudio mientras que en otros estudios con la enfermedad más propagada, se puede considerarse la administración sistémica. Este ensayo de fase I/IIa evaluará un máximo de 17-26 pacientes dependiente del perfil de seguridad. De manera breve, una primera cohorte de pacientes recibirá una dosis única de Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL (1×10^{11} VP) complementaria a su tratamiento con gemcitabina de tratamiento habitual. La siguiente cohorte recibirá una dosis de aumento escalonado de 5×10^{11} VP de Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL (figura 22). Si la dosis única es segura, la siguiente cohorte recibirá dosis repetidas (6x) de Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL (5×10^{11} VP/tratamiento) complementarias al tratamiento habitual (figura 23). Se monitorizarán los pacientes para determinar la seguridad, la eficacia sobre el control del tumor, la farmacocinética del virus y la formación de anticuerpos anti-virus así como para determinar la activación inmunitaria incluyendo células inmunitarias fenotípicas y midiendo el suero o plasma y las biopsias para marcadores de proteína tales como citocinas. Un ensayo de fase I/IIa exitoso conducirá a un estudio de fase IIb aleatorizado que compara gemcitabina sola con la combinación de gemcitabina y Ad5/35-TMZ-CD154/4-1BBL.

A continuación, se describe el estudio en más detalle.

30 *Producto de investigación: LOAd703*

Sustancia activa: adenovirus de serotipo 5/35 modificado que contiene un casete transgénico impulsado por el promotor CMV con los transgenes humanos para un ligando CD40 unido a membrana (TMZ-CD40L) y 4-1BBL de longitud completa.

35 Fabricante: Baylor College de Medicina, Houston, TX.

Dosis: $1-5 \times 10^{11}$ partículas de virus (VP) en 500 µl de suspensión por inyección. Una mayor concentración de partículas virales en 500 µl de suspensión puede causar la agregación de las partículas virales y no se recomienda.

Forma de dosificación: partículas adenovirales de LOAd703 en suspensión, 650 µl por vial, 1×10^{12} VP/ml, (dosis baja; 2×10^{11} VP/ml).

45 *Administración*

LOAd703 se administrará mediante inyección intratumoral guiada por imagen de 500 µl de virus LOAd703 en suspensión. Dependiendo de la localización del tumor, pueden usarse diferentes técnicas de imagen a la discreción del investigador.

50 Para tumores fácilmente accesibles para inyección percutánea, puede administrarse LOAd703 preferiblemente mediante inyección abdominal percutánea guiada por ultrasonidos de la metástasis del tumor. Otros tumores pueden ser más accesibles a través de inyección endoscópica guiada por ultrasonidos. Otras técnicas de obtención de imágenes tales como inyecciones guiadas por tomografía computarizada (CT) también pueden usarse a la discreción del investigador.

Fundamento para las dosis de fase I/IIa

60 La dosis inicial será una única inyección de 1×10^{11} VP de LOAd703 en una suspensión de 500 µl por tratamiento. El fundamento se basa en experiencias previas con inyección intratumoral del predecesor de AdCD40L que se ha inyectado repetidamente de manera segura (4-8) a la dosis de $2,5 \times 10^{11}$ VP en una suspensión de 500 µl. Se eligió una dosis inicial menor dado que LOAd703 a diferencia de AdCD40L es un virus oncolítico. Si esta dosis es segura en dos pacientes inscritos, el siguiente nivel de dosis es una dosis única de 5×10^{11} VP en una suspensión de 500 µl, que se administrará a dos pacientes adicionales. Los siguientes tres pacientes recibirán seis inyecciones intratumorales de LOAd703 cada dos semanas de la dosis elegida. Si es seguro, se usará la dosis múltiple para diez pacientes en la parte de la fase IIa del estudio para confirmar la seguridad en una cohorte más grande.

65

5 Dado que el sistema inmunitario se aumenta de manera escalonada para la reactividad tras la exposición repetida a estimulación, no se esperaba que quedara eficacia, o toxicidad, en los pacientes de dosis única. Se ha elegido por tanto el diseño 2+2 durante el aumento escalonado de la dosis usando dosis única, y para la dosis múltiple se usan 3 pacientes estándar para confirmar la seguridad antes de entrar en la fase IIa.

Si se determina la toxicidad limitante de dosis (DLT), pueden realizarse ajustes de la dosis.

10 *Población de pacientes*

10 El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es uno de los cánceres más agresivos y tiene la tasa de mortalidad más alta de todos los cánceres principales. Incluso si el cáncer de páncreas es una indicación de orfandad, es el cuarto cáncer más mortal en los EEUU. Inicialmente, hay pocos síntomas y, por tanto, los pacientes se diagnostican a menudo cuando el tumor ya ha metastatizado. Tiene un perfil altamente resistente a fármacos y pocos fármacos han mostrado un beneficio de supervivencia significativo. Actualmente, el tratamiento habitual es gemcitabina, pero recientemente se aprobó la terapia de combinación con otros fármacos tales como paclitaxel para el cáncer de páncreas metastático. El 10-20% de los pacientes diagnosticados tienen cáncer localizado pero sólo el 20% de ellos se someten a cirugía con quimioterapia adyuvante. La supervivencia de 1 año para el cáncer de páncreas es aproximadamente del 20% y después de 5 años, sólo el 6% siguen vivos. Sin embargo, considerando solo el subgrupo de pacientes elegibles para cirugía, la supervivencia global a los 5 años es del 20%.

En este estudio, se inscribirán pacientes con enfermedad localmente avanzada (lesión única) y aquellos con lesiones avanzadas pero pocas (2-3).

25 *Objetivo del estudio y criterios de valoración*

Los pacientes diagnosticados con PDAC tienen opciones de tratamiento limitadas y un pronóstico lúgubre incluso si el tumor todavía está localizado en el páncreas o ha metastatizado en sólo unos pocos sitios. La terapia génica inmunoestimuladora local puede ser valiosa para pacientes con una sola o pocas lesiones pero con perfil de alto riesgo. Estos pacientes recibirán su terapia de tratamiento habitual (gemcitabina) que no sólo seleccionará como diana el tumor sino que también reducirá los niveles de células inmunitarias supresoras. LOAd703 se administrará a una única lesión. Las partículas de adenovirus propiamente dichas interactuarán con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como TLR2 y TLR9 que conducen a respuestas inflamatorias. La oncólisis ayudará a la captación del antígeno por células que presentan antígenos tales como DC y permitirá a viriones nuevos infectar células cercanas prolongando la expresión de los transgenes inmunoestimuladores. Mientras que TMZ-CD40L puede activar las DC que engloban antígenos tumorales para estimular respuestas *de novo* de CTL, linfocitos citolíticos naturales y macrófagos M1 y activa células endoteliales para aumentar la entrada de linfocitos en el parénquima tumoral, 4-1BBL puede reestimular células T infiltrantes de tumor y linfocitos citolíticos naturales preexistentes para ayudar a la erradicación de células tumorales así como prolongar la supervivencia de las células inmunitarias estimuladas *de novo* cuando entran al tumor. La inmunidad generada puede luego también actuar sobre células tumorales distantes para reducir la tasa de crecimiento del tumor o incluso prevenir la formación de nuevas lesiones metastásicas.

45 *Objetivos*

Fase I

50 El objetivo de la fase I es determinar la factibilidad y seguridad de la inyección intratumoral guiada por imagen de LOAd703 a dos niveles de dosis, dos pacientes por dosis y seis inyecciones repetidas de la dosis elegida en tres pacientes durante el tratamiento de tratamiento habitual.

Fase IIa

55 El objetivo de la fase IIa es determinar la seguridad y el efecto de terapia de LOAd703 repetida combinada con una pauta de tratamiento habitual.

Criterios de valoración

60 *Fase I*

El criterio de evaluación del componente de la fase I es evaluar la toxicidad.

1. Toxicidad mediante criterios convencionales usando examen físico, análisis hematológico y de bioquímica clínica.

65 2. Copias de virus de LOAd703 en sangre y biopsias (sólo dosis múltiple) usando PCR en tiempo real cuantitativa.

3. Anticuerpos anti-adenovirales en sangre usando ELISA.

4. Perfil inmunológico de proteínas en sangre y lisados tumorales (sólo dosis múltiple) mediante ELISA y/o métodos basados en múltiplex tales como ProSeek.

5. Perfil inmunológico de células en sangre mediante citometría de flujo y ELISPOT.

6. Efecto sobre el tumor mediante obtención de imágenes apropiada dependiendo de la localización del tumor y monitorizando el marcador tumoral CA 19-9.

Fase IIa

Los criterios de evaluación de la parte de la fase IIa son efectos sobre el tumor y la seguridad.

1. Toxicidad mediante criterios convencionales usando examen físico, análisis hematológico y de bioquímica clínica.

2. Copias de virus de LOAd703 en sangre y biopsias usando PCR en tiempo real cuantitativa.

3. Anticuerpos anti-adenovirales en sangre usando ELISA.

4. Perfil inmunológico de proteínas en sangre y lisados tumorales mediante ELISA y/o métodos basados en múltiplex tales como ProSeek.

5. Perfil inmunológico de células en sangre mediante citometría de flujo y ELISPOT.

6. Efecto sobre el tumor mediante obtención de imágenes apropiada dependiendo de la localización del tumor y monitorizando el marcador tumoral CA 19-9.

Diseño del ensayo

Sumario del diseño del ensayo

El ensayo consiste en una fase I de aumento escalonado de la dosis con dosis única y múltiple, y fase IIa de confirmación con dosis múltiple al nivel de dosis seleccionado en la fase I. Se inscribirán 7 pacientes en la fase I a menos que la DLT requiera ajustes de la dosis y cohortes adicionales antes de entrar en la fase IIa. Por tanto, puede tratarse un máximo de 7-16 pacientes en la fase I. Se inscribirá un máximo de 10 pacientes en el componente de la fase IIa. Aplicando la metodología de Gehan, el riesgo de que LOAd703 carezca de manera incorrecta de efecto (OR) después de 10 pacientes en la fase IIa en al menos un paciente a pesar del hecho de que el tratamiento en realidad confiere hasta el 30% de OR, es menos del 5%. En total, el estudio pretende tratar un máximo de 17-26 pacientes.

Fase I

Se informará a los pacientes sobre el estudio y firmarán la autorización por escrito mediante la que entran a una fase de cribado para determinar la elegibilidad incluyendo el muestreo para el estado de salud y radiología. Los pacientes iniciarán su primer ciclo de tres semanas de tratamiento habitual con gemcitabina (1000 mg/m^2) seguido por una semana de descanso. Durante la semana de descanso, los primeros dos pacientes recibirán una dosis de inyección intratumoral guiada por imagen de 1×10^{11} VP de LOAd703 y los dos pacientes consecutivos una dosis de 5×10^{11} VP de LOAd703 (figura 22). El tratamiento de los dos pacientes consecutivos puede empezar cuando los dos primeros pacientes hayan superado el seguimiento final sin toxicidad limitante de dosis (DLT). Los pacientes permanecerán durante la noche después del tratamiento con virus para observación. Posteriormente, los pacientes continuarán otro ciclo de tres semanas de gemcitabina y una semana de descanso. Se tomarán muestras de sangre para evaluar la toxicidad, la farmacocinética del virus (por ejemplo, la propagación a la sangre) y reacciones inmunitarias tal como se indica en la figura 22. Durante el cribado del estudio y el seguimiento final, los pacientes se someterán a radiología después de la que abandonarán el estudio.

Si el régimen de dosis única es seguro, los siguientes tres pacientes recibirán múltiples inyecciones intratumorales (6x) cada dos semanas en paralelo a su tratamiento habitual de terapia con gemcitabina (figura 23). Si no se producen reacciones inmediatas después de la inyección de LOAd703 durante el aumento escalonado de la dosis en los primeros cuatro pacientes de dosis única, los pacientes que reciben dosis múltiple no necesitan permanecer durante la noche pero se observarán durante al menos 4 horas después de la inyección del virus, a la discreción del investigador, y pueden darse de alta del hospital.

Se tomarán las biopsias antes de la primera y una semana después de la última inyección de LOAd703. Se tomarán muestras de sangre a diferentes puntos de tiempo para evaluar la toxicidad, la farmacocinética del virus (por ejemplo, la propagación a la sangre) y reacciones inmunitarias tal como se indica en la figura 23. Cada mes, se

usará la imagen para determinar el tamaño del tumor. A los seis meses, los pacientes se someterán a análisis del seguimiento final y después el paciente abandonará el estudio. Después de la participación en el ensayo, los pacientes continuarán su régimen de tratamiento habitual de acuerdo con las rutinas clínicas en el hospital.

5 Cuando tres pacientes se hayan tratado con una dosis segura de múltiples inyecciones del virus, tal como se juzga cuando todos estos pacientes hayan pasado al menos dos semanas desde la dosis del virus final, puede iniciarse la parte de la fase IIa del ensayo.

Si se produce DLT durante el aumento escalonado de la dosis o dosis múltiple, debe ajustarse la dosis.

10 *Fase IIa*

15 Se informará a los pacientes sobre el estudio y firmarán la autorización por escrito mediante la que entran a una fase de cribado para determinar la elegibilidad incluyendo el muestreo para el estado de salud y obtención de imágenes. Los pacientes iniciarán su primer ciclo de tres semanas de tratamiento habitual con gemcitabina (1000 mg/m²) seguido por una semana de descanso. Durante la semana de descanso, los pacientes iniciarán un tratamiento con LOAd703 con inyección intratumoral guiada por imagen de la dosis seleccionada de LOAd703. Las inyecciones de LOAd703 se proporcionarán cada dos semanas en paralelo a su tratamiento habitual de terapia con gemcitabina. Se proporcionarán seis dosis de virus.

20 Se tomarán las biopsias antes de la primera y una semana después de la última inyección de LOAd703. Se tomarán muestras de sangre a diferentes puntos de tiempo para evaluar la toxicidad, la farmacocinética del virus (por ejemplo, la propagación a la sangre) y reacciones inmunitarias tal como se indica en la figura 23. Cada mes, la radiología determinará el tamaño del tumor. A los seis meses, los pacientes se someterán a análisis del seguimiento final y después el paciente abandonará el estudio. Después de la participación en el ensayo, los pacientes continuarán su régimen de tratamiento habitual de acuerdo con las rutinas clínicas en el hospital. En total, se tratarán 10 pacientes en la fase IIa.

30 *Duración del estudio*

Los pacientes participarán en el estudio durante de dos (dosis única) a seis meses (dosis múltiple). En total, se inscribirán 17-26 pacientes. El estudio se estima que va a completarse en 2 años.

35 *Final del estudio*

El final del estudio se define como la fecha de la última visita del último paciente sometido al ensayo.

Lista de secuencias

40 <110> Lokon Pharma AB

<120> Agentes médicos novedosos y uso de los mismos

45 <130> P013660PCT1

<160> 29

<170> BiSSAP 1.3

50 <210> 1

<211> 846

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55 <220>

<223> TMZ-CD154

<400> 1

ES 2 744 479 T3

gccacccatga gaatgaagca gatcgaggac aagatcgagg agatcctgag caagatctac 60
cacatcgaga acgagatcgc cagaatcaag aagctgatcg gcgagagagg cggccggggc 120
ggcggcattt ttatgtattt acttactggt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca 180
ctttttgctg tgtatcttca tagaagggtg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat 240
gaagattttg tattcatgaa aacgatacag agatgcaaca caggagaaag atccttatcc 300
ttactgaact gtgaggagat taaaagccag tttgaaggct ttgtgaagga tataatgta 360
aacaagagg agacgaagaa agaaaacagc tttgaaatgc aaaaagggtga tcagaatcct 420
caaatgctg cecatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa caacatctgt gttacagtgg 480
gctgaaaaag gatactacac catgagcaac aacttggtta ccctggaaa tgggaaacag 540
ctgaccgtta aaagacaag actctattat atctatgcc aagtcacctt ctgttccaat 600
cgggaagctt cgagtcaagc tccatttata gccagcctt gcctaaagtc ccccggtaga 660
ttcgagagaa tcttactcag agctgcaaat acccacagtt ccgccaacc ttgctggcaa 720
caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaat 780
gtgactgatc caagccaagt gagccatggc actggcttca cgtcctttgg cttactcaaa 840
ctctga 846

<210> 2
<211> 279
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <223> TMZ-CD154

<400> 2
Met Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
1 5 10 15

ES 2 744 479 T3

Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 20 25 30
 Glu Arg Gly Gly Arg Gly Gly Gly Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val
 35 40 45
 Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu
 50 55 60
 His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp
 65 70 75 80
 Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser
 85 90 95
 Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe
 100 105 110
 Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser
 115 120 125
 Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
 130 135 140
 Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu
 145 150 155 160
 Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
 165 170 175
 Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
 180 185 190
 Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
 195 200 205
 Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu
 210 215 220
 Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
 225 230 235 240
 Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
 245 250 255
 Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr
 260 265 270
 Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 275

<210> 3
 <211> 846
 5 <212> ADN
 <213> *Equus caballus*

<220>
 <223> TMZ-CD154

10 <400> 3

ES 2 744 479 T3

gccaccatga gaatgaagca gatcgaggac aagatcgagg agatcctgag caagatctac 60
cacatcgaga acgagatcgc cagaatcaag aagctgatcg gcgagagagg cggccggggc 120
ggcggcattt ttatgtattt gcttactggt tttcttatca cccagatgat tgtgtcagca 180
ctttttgctg tgtatcttca cagaagattg gacaagatag aagatgaaag gaatcttcat 240
gaagattttg tgttcatgaa aacgatacag agatgcaaca aaggagaggg gcctttatca 300
ttactgaact gtgaggaaat tagaagccag ttcgaaggct tcgtcaagga tataatgcta 360
aatgaagaag tgaagaagaa aggagaaaac tttgaaatgc aaaaaggcga tcaggagcct 420
caaattgctg cacatgtcat aagtgaggcc agcagtaaaa cagcatctgt tctacagtgg 480
gccccaaaag gatactacac cataagcaac aacttggtta ccctcgaaa tgggaaacag 540
ctggccgtta aaagacaag actctattat atctatgcc aagtcacctt ctggtccaat 600
cgggaagctt cgggtcaagc tccatttata gccagcctct gcctgaggtc cgtgagtgga 660
tctgagagaa tcttacttag agcggcaaat acccacagtt cctccaaacc ttgcgggcag 720
caatccattc acttgggagg agtatttgaa ttgcaaccag gtgcttcggt gtttgtcaac 780
gtgactgatc caagccaagt gagccatggg accggcttca catcttttgg tttactcaaa 840
ctctga 846

5 <210> 4
<211> 844
<212> ADN
<213> *Canis lupus familiaris*

10 <220>
<223> TMZ-CD154

<400> 4

ES 2 744 479 T3

gccaccatga gaatgaagca gatcgaggac aagatcgagg agatcctgag caagatctac 60
cacatcgaga acgagatcgc cagaatcaag aagctgatcg gcgagagagg cggccggggc 120
ggcggcattt ttatgtattt gcttactggt tttctcatca cccagatgat tggatcggca 180
ctctttgctg tatatcttca cagaagattg gacaagatag aagatgaaag gaatctttat 240
gaagattttg tgttcatgaa aacggtacag aatgcaaca aaggggaggg gtccttgtcc 300
ttactgaact gtgaggaaat taaaagccaa tttgaagcct ttctcaagga gataatgcta 360
aacaacgaaa tgaagaaaga agaaaacatt gcaatgcaaa aaggtgatca ggatcctcga 420
attgcagccc atgtcataag tgaggctagt agtaaccag cgtccgttct gcggtgggag 480
ccaaaagggt actacaccat aagcagcaac ctggtgagcc tcgagaatgg gaaacagttg 540
gccgtgaaaa gacaaggact ctattacgtc tatgcccaag tcaccttctg ctccaatcgg 600
gcagcttcca gtcaagctcc gttcgtcgcc agcctatgcc tccattcccc gagtggaacg 660
gagagagtct tactccgagc cgcgagctcc cgcggtcgt ccaaacttg cggccaacag 720
tccatccact tgggaggagt atttgaattg catccaggtg cttcgggtgt cgtcaacgtg 780
actgatccaa gccaaagtgag ccacgggacc ggcttcacgt cttttggctt actcaaactc 840
tga 844

<210> 5
<211> 844
5 <212> ADN
<213> *Felis catus*

<220>
10 <223> TMZ-CD154

<400> 5
gccaccatga gaatgaagca gatcgaggac aagatcgagg agatcctgag caagatctac 60

ES 2 744 479 T3

cacatcgaga acgagatcgc cagaatcaag aagctgatcg gcgagagagg cggccggggc 120
 ggcggcattt ttatgtattt acttactgtg tttctcatca cccagatgat tgggtcagca 180
 ctctttgctg tgtatcttca cagaagactg gacaagatag aagatgaaag gaatctttat 240
 gaagatthttg tgttcatgaa aacattacag aaatgcaaca aaggagaggg ggccttatcc 300
 ttactgaact gtgaggaaat taaaagccgg tttgaagcct ttctcaagga gataatgcta 360
 aacaaagaaa cgaagaaaga aaaaaatggt gcaatgcaaa aaggcgacca ggatcctcga 420
 gttgcagcac atgtcataag tgaggccagc agtagcacag cgtctgttct ccagtgggcc 480
 cccaaaggct actacaccat aagcagcaac ttggtgacct tcgagaacgg gaagcagctg 540
 gccgttaaaa gacaaggact ctattatatac tacgcccaag tcaccttctg ttccaatcgg 600
 gaagcttcga gtcaagctcc gttcatagcc agcctctgcc tgcattcccc gagtggatcc 660
 gagagagtct tactcagagc tgcaaatgcc cgcagttcct ccaaaccctg tgggcagcaa 720
 tccattcact tgggaggagt cttcgaactg catccagggtg cttcgggtgtt cgtgaacgtg 780
 actgatccga gccaaagtgag ccacgggacg ggcttcacgt cttttggctt actcaaactc 840
 tgaa 844

<210> 6
 <211> 1668
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> TMZ-CD154/4-1BBL

10

<400> 6
 gccaccatgg aatacgcctc tgacgcttca ctggaccccc aagccccgtg gcctcccgcg 60
 ccccgcgctc gcgcctgccg cgtactgcct tgggccctgg tcgcggggct gctgctgctg 120
 ctgctgctcg ctgccgcctg cgccgtcttc ctgcctgcc cctgggccgt gtccggggct 180
 cgcgcctcgc ccggtccgc gccagcccc agactccgcg aggggtcccga gctttcggcc 240
 gacgatcccc ccggcctctt ggacctgcgg cagggcatgt ttgcgcagct ggtggcccaa 300
 aatgttctgc tgatcgatgg gccctgagc tggtagctg acccaggcct ggcaggcgtg 360
 tccctgacgg ggggcctgag ctacaaagag gacacgaagg agctggtggt ggccaaggct 420
 ggagtctact atgtcttctt tcaactagag ctgcggcgcg tggtagccgg cgagggctca 480
 ggctccgtht cacttgcgct gcacctgcag ccaactgcgct ctgctgctgg ggccgccgcc 540
 ctggctttga ccgtggacct gccacccgcc tcctccagg ctcggaactc ggccttcggt 600
 ttccagggcc gcttgcctgca cctgagtgcc ggccagcgcc tgggctcca tcttcacact 660
 gaggccaggg cacgccatgc ctggcagctt acccagggcg ccacagtctt gggactcttc 720
 cgggtgacct ccgaaatccc agccggactc ccttcaccga ggtcgggaagg ctccggggag 780

ES 2 744 479 T3

ggcagaggaa gtctgctaac atgCGgtgac gtcgaggaga atcctggggc cagaatgaag 840
 cagatcgagg acaagatcga ggagatcctg agcaagatct accacatcga gaacgagatc 900
 gccagaatca agaagctgat cggcgagaga ggcggccggg gcggcggcat ttttatgtat 960
 ttacttactg tttttcttat caccagatg attgggtcag cactttttgc tgtgtatctt 1020
 catagaaggt tggacaagat agaagatgaa aggaatcttc atgaagattt tgtattcatg 1080
 aaaacgatac agagatgcaa cacaggagaa agatccttat cttactgaa ctgtgaggag 1140
 attaaaagcc agtttgaagg ctttgtgaag gatataatgt taaacaaaga ggagacgaag 1200
 aaagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgtc 1260
 ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac 1320
 accatgagca acaacttggg aaccctggaa aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa 1380
 ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa 1440
 gctccattta tagccagcct ctgcctaaag tccccggta gattcgagag aatcttactc 1500
 agagctgcaa ataccacag ttccgcaaaa ccttgcgggc aacaatccat tcacttggga 1560
 ggagtatattg aattgcaacc aggtgcttcg gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa 1620
 gtgagccatg gcaactggctt cacgtccttt ggcttactca aactctga 1668

<210> 7
 <211> 551
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> TMZ-CD154/4-1BBL

10

<400> 7
 Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val
 20 25 30
 Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe
 35 40 45
 Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser
 50 55 60
 Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp
 65 70 75 80
 Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val
 85 90 95
 Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp
 100 105 110
 Pro Gly Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Asp
 115 120 125
 Thr Lys Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe Phe Gln
 130 135 140
 Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala
 165 170 175

ES 2 744 479 T3

Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala Arg Asn
 180 185 190
 Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Gly Gln
 195 200 205
 Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His Ala Trp
 210 215 220
 Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val Thr Pro
 225 230 235
 Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu Gly Ser Gly Glu
 245 250 255
 Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 260 265 270
 Pro Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys
 275 280 285
 Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly
 290 295 300
 Glu Arg Gly Gly Arg Gly Gly Gly Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val
 305 310 315
 Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu
 325 330 335
 His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp
 340 345 350
 Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser
 355 360 365
 Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe
 370 375 380
 Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser
 385 390 395 400
 Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
 405 410 415
 Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu
 420 425 430
 Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
 435 440 445
 Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
 450 455 460
 Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
 465 470 475 480
 Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu
 485 490 495
 Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
 500 505 510
 Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe
 515 520 525
 Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr
 530 535 540
 Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 545 550

<210> 8
 <211> 1698
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TMZ-CD154/aLL6R scFv

10 <400> 8

ES 2 744 479 T3

gccaccatgc acagctcagc actgctctgt tgcctgggcc tcctgactgg ggtgagggcc 60
caggtccaac tgcaggagag cgggccaggt cttgtgagac ctagccagac cctgagcctg 120
acctgcaccg tgtctggcta ctcaattacc agcgatcatg cctggagctg ggttcgccag 180
ccacctggac gaggtcttga gtggattgga tacattagtt atagtggaat cacaacctat 240
aatccatctc tcaaatccag agtgacaatg ctgagagaca ccagcaagaa ccagttcagc 300
ctgagactca gcagcgtgac agccgccgac accgcggttt attattgtgc aagatcccta 360
gctcggacta cggctatgga ctactggggg caaggcagcc tcgtcacagt ctctcaggt 420
ggcgggtggct cgggtggcgg tggctcgggc ggtggtgggt cgggtggcgg cggatcagac 480
atccagatga cccagagccc aagcagcctg agcgcagcg tgggtgacag ggtgaccatc 540
acctgtcgag ccagccagga catcagcagt tacctgaatt ggtaccagca gaagccagga 600
aaggctccaa agctgctgat ctactacacc tcccgcctgc actctggtgt gccaaagcaga 660
ttcagcggta gcggtagcgg taccgacttc accttcacca tcagcagcct ccagccagag 720
gacatcgcta cctactactg ccagcagggg aacacgcttc catacacgtt cggccaaggg 780
accaaggtgg aaatcaaagc ctccggggag ggagaggaa gtctgctaac atgcggtgac 840
gtcgaggaga atcctgggcc cagaatgaag cagatcgagg acaagatcga ggagatcctg 900
agcaagatct accacatcga gaacgagatc gccagaatca agaagctgat cggcgagaga 960
ggcggccggg gcggcggcat ttttatgtat ttacttactg tttttcttat caccagatg 1020
attgggtcag cactttttgc tgtgtatctt catagaaggt tggacaagat agaagatgaa 1080
aggaatcttc atgaagattt tgtattcatg aaaacgatac agagatgcaa cacaggagaa 1140
agatccttat ccttactgaa ctgtgaggag attaaaagcc agtttgaagg ctttgtgaag 1200
gatataatgt taaacaaaga ggagacgaag aaagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt 1260
gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgac ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct 1320
gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac accatgagca acaacttggg aaccctgaa 1380
aatgggaaac agctgaccgt taaaagacaa ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc 1440
ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa gctccattta tagccagcct ctgcctaaag 1500
tccccggta gattcgagag aatcttactc agagctgcaa ataccacag ttccgcaaaa 1560
ccttgccggc aacaatccat tcacttggga ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg 1620
gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa gtgagccatg gcactggctt cacgtccttt 1680
ggcttactca aactctga 1698

5 <210> 9
<211> 563
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> TMZ-CD154/aIL6R scFv

<400> 9

ES 2 744 479 T3

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro
 20 25 30
 Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 145 150 155 160
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 165 170 175
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp
 180 185 190
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr
 195 200 205
 Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 225 230 235 240
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser
 260 265 270
 Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Lys
 275 280 285
 Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile
 290 295 300
 Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Gly
 305 310 315 320
 Arg Gly Gly Gly Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu Ile Thr
 325 330 335
 Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg Arg Leu
 340 345 350
 Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val Phe Met
 355 360 365
 Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser Leu Leu
 370 375 380
 Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys Asp Ile
 385 390 395 400
 Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu Met Gln
 405 410 415
 Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser Glu Ala
 420 425 430
 Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr
 435 440 445
 Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln Leu Thr
 450 455 460
 Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr Phe Cys
 465 470 475 480
 Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser Leu Cys
 485 490 495
 Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala Ala Asn

ES 2 744 479 T3

			500					505					510			
Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His	Leu	Gly	
		515					520					525				
Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn	Val	Thr	
	530					535					540					
Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	Gly	Leu	
545					550					555					560	
Leu	Lys	Leu														

<210> 10
 <211> 261
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CD154 de longitud completa

10 <400> 10

Met	Ile	Glu	Thr	Tyr	Asn	Gln	Thr	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Ala	Thr	Gly	
1				5					10					15		
Leu	Pro	Ile	Ser	Met	Lys	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	Thr	Val	Phe	Leu	
			20					25					30			
Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	Tyr	Leu	His	Arg	
		35					40					45				
Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val	
		50				55					60					
Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser	
65					70					75					80	
Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Lys	
			85						90					95		
Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu	
			100					105					110			
Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asn	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Ile	Ser	
		115					120					125				
Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly	
		130				135					140					
Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln	
145					150					155					160	
Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr	
			165						170					175		
Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser	
			180				185						190			
Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala	
		195					200					205				
Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His	
		210				215					220					
Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn	
225					230					235					240	
Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe	
				245					250					255		
Gly	Leu	Leu	Lys	Leu												
			260													

15 <210> 11
 <211> 648
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Residuos 199-846 de Seq_1

<400> 11

ES 2 744 479 T3

catagaaggt tggacaagat agaagatgaa aggaatcttc atgaagattt tgtattcatg 60
 aaaacgatac agagatgcaa cacaggagaa agatccttat ccttactgaa ctgtgaggag 120
 attaaaagcc agtttgaagg ctttgtgaag gatataatgt taacaaaga ggagacgaag 180
 aaagaaaaca gctttgaaat gcaaaaaggt gatcagaatc ctcaaattgc ggcacatgtc 240
 ataagtgagg ccagcagtaa aacaacatct gtgttacagt gggctgaaaa aggatactac 300
 accatgagca acaacttggc aaccctggaa aatgggaaac agctgaccgt taaaagacia 360
 ggactctatt atatctatgc ccaagtcacc ttctgttcca atcgggaagc ttcgagtcaa 420
 gctccattta tagccagcct ctgcctaaag tccccggta gattcgagag aatcttactc 480
 agagctgcaa ataccacag ttccgcaaaa ccttgccggc aacaatccat tcacttggga 540
 ggagtatttg aattgcaacc aggtgcttcg gtgtttgtca atgtgactga tccaagccaa 600
 gtgagccatg gcaactggctt cacgtccttt ggcttactca aactctga 648

<210> 12
 <211> 720
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Residuos 127-846 de Seq_3

10

<400> 12
 atttttatgt atttgcttac tgtttttctt atcaccaga tgattgtgtc agcacttttt 60
 gctgtgtatc ttcacagaag attggacaag atagaagatg aaaggaatct tcatgaagat 120
 tttgtgttca tgaaaacgat acagagatgc acaaaggag aggggccttt atcattactg 180
 aactgtgagg aaattagaag ccagttcgaa ggcttcgtca aggatataat gctaaatgaa 240
 gaagtgaaga agaaaggaga aaactttgaa atgcaaaaag gcgatcagga gcctcaaatt 300
 gcggcacatg tcataagtga ggccagcagt aaaacagcat ctgttctaca gtgggcccaa 360
 aaaggatact acaccataag caacaacttg gtaaccctcg aaaatgggaa acagctggcc 420
 gttaaaagac aaggactcta ttatatctat gcccaagtca ctttctgttc caatcgggaa 480
 gcttcggggtc aagctccatt tatagccagc ctctgcctga ggtccgtgag tggatctgag 540
 agaatcttac ttagagcggc aataccac agttcctcca aaccttgcgg gcagcaatcc 600
 attcacttgg gaggagtatt tgaattgcaa ccaggtgctt cgggtgtttgt caacgtgact 660
 gatccaagcc aagtgagcca tgggaccggc ttcacatctt ttggtttact caaactctga 720

<210> 13
 <211> 718
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Residuos 127-844 de Seq_4

20

ES 2 744 479 T3

<400> 13
 atttttatgt atttgcttac tgtttttctc atcaccaga tgattggatc ggcactcttt 60
 gctgtatatac ttcacagaag attggacaag atagaagatg aaaggaatct ttatgaagat 120
 tttgtgttca tgaaaacgtt acagaaatgc acaaagggg aggggtcctt gtccttactg 180
 aactgtgagg aaattaanaag ccaatttgaa gcctttctca aggagataat gctaaacaac 240
 gaaatgaaga aagaagaaaa cattgcaatg caaaaagggtg atcaggatcc tcgaattgca 300
 gcccatgtca taagtgaggc tagtagtaac ccagcgtccg ttctgcgggtg ggcgcaaaa 360
 ggggtactaca ccataagcag caacctgggtg agcctcgaga atgggaaaca gttggccgtg 420
 aaaagacaag gactctatta cgtctatgcc caagtcacct tctgctcaa tcgggcagct 480
 tcgagtcaag ctccgttcgt cgccagccta tgcctcatt ccccgagtgg aacggagaga 540
 gtcttactcc gcgcccgcgag ctcccgcggc tcgtccaaac cttgcggcca acagtccatc 600
 cacttgggag gagtatttga attgcatcca ggtgcttcgg tgttcgtcaa cgtgactgat 660
 ccaagccaag tgagccacgg gaccggcttc acgtcttttg gcttactcaa actctgaa 718

5 <210> 14
 <211> 718
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Residuos 127-844 de Seq_5

<400> 14
 atttttatgt atttacttac tgtgtttctc atcaccaga tgattgggtc agcactcttt 60
 gctgtgtatac ttcacagaag actggacaag atagaagatg aaaggaatct ttatgaagat 120
 tttgtgttca tgaaaacatt acagaaatgc acaaaggag agggggcctt atccttactg 180
 aactgtgagg aaattaanaag ccggtttgaa gcctttctca aggagataat gctaaacaaa 240
 gaaacgaaga aagaaaaaaa tgttgcaatg caaaaaggcg accaggatcc tcgagttgca 300
 gcacatgtca taagtgaggc cagcagtagc acagcgtctg ttctccagtg ggccccaaa 360
 ggctactaca ccataagcag caacttgggtg accctcgaga acgggaagca gctggccgtt 420
 aaaagacaag gactctatta tatctacgcc caagtcacct tctgctcaa tcgggaagct 480
 tcgagtcaag ctccgttcat agccagcctc tgcctgcatt ccccgagtgg atccgagaga 540
 gtcttactca gagctgcaaa tgcccgcagt tcctccaaac cctgtgggca gcaatccatt 600
 cacttgggag gagtcttcga actgcatcca ggtgcttcgg tgttcgtgaa cgtgactgat 660
 ccgagccaag tgagccacgg gacgggcttc acgtcttttg gcttactcaa actctgaa 718

15 <210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 744 479 T3

<220>
 <223> Residuos 1-22 de SEQ ID NO: 10

5 <400> 15
 Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ile Ser Met Lys
 20

<210> 16
 <211> 66
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ID de residuos 1-22 de SEQ ID 10

15 <400> 16
 atgatcgaaa catacaacca aacttctccc cgatctgagg cactggact gccatcagc 60
 atgaaa 66

<210> 17
 <211> 78
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Residuos 127-198 de SEQ ID NO: 1

<400> 17
 ggcgccattt ttatgtattt acttactggt tttcttatca cccagatgat tgggtcagca 60
 ctttttgctg tgtatcct 78

30 <210> 18
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> TD de residuos 127-198 de SEQ ID 1

<400> 18
 Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly
 1 5 10 15
 Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu
 20

40 <210> 19
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Dominio transmembrana de OX40 humano

<400> 19
 Leu Leu Leu Val Ala Ser Val Ile Gln Gly Leu Gly Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Phe Thr Tyr Ile Cys Leu His Phe Ser Ala Leu
 20 25

50 <210> 20

ES 2 744 479 T3

<211> 81
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> TD derivado de ligando Ox40 humano

<400> 20
 ctattgctgg tggcctctgt aattcagggg ctggggctgc tcctgtgctt cacctacatc 60
 tgccctgcaact tctctgctct t 81

10 <210> 21
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Dominio transmembrana de CD70 humano

<400> 21
 Leu Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Cys Leu
 1 5 10 15
 Val Val Cys Ile
 20 20

25 <210> 22
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> TD derivado de CD70 humano (aa 18-38)

<400> 22
 ctgcgggctg ctttggctcc attggtcgcg ggcttgggtga tctgcctcgt ggtgtgcatc 60

35 <210> 23
 <211> 99
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Residuos 10-108 de la cremallera de isoleucina de Seq_1

<400> 23
 agaatgaagc agatcgagga caagatcgag gagatcctga gcaagatcta ccacatcgag 60
 aacgagatcg ccagaatcaa gaagctgatc ggcgagaga 99

45 <210> 24
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> ED - proteína correspondiente a Seq_11

<400> 24

ES 2 744 479 T3

His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser
 20 25 30
 Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe
 35 40 45
 Val Lys Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser
 50 55 60
 Phe Glu Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val
 65 70 75 80
 Ile Ser Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu
 85 90 95
 Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly
 100 105 110
 Lys Gln Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln
 115 120 125
 Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile
 130 135 140
 Ala Ser Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu
 145 150 155 160
 Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser
 165 170 175
 Ile His Leu Gly Gly Val Phe Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val
 180 185 190
 Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser
 195 200 205
 Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 210

<210> 25
 <211> 23
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> TD proteína correspondiente a Seq_17

10 <400> 25
 Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser
 1 5 10 15
 Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu
 20

15 <210> 26
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CD40L humano con cambios 114, 115, 117-120

<400> 26
 Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg

ES 2 744 479 T3

	35					40				45					
Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	Glu	Asp	Phe	Val
	50					55					60				
Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Thr	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser
65					70					75				80	
Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Phe	Val	Lys
				85					90					95	
Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Asn	Ser	Phe	Glu
		100						105					110		
Met	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Asp	Ser	Gln	Ile	Ala	Ala	His	Val	Ile	Ser
		115						120					125		
Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala	Glu	Lys	Gly
	130					135					140				
Tyr	Tyr	Thr	Met	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Gln
145					150					155					160
Leu	Thr	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Val	Thr
				165					170					175	
Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe	Ile	Ala	Ser
			180					185					190		
Leu	Cys	Leu	Lys	Ser	Pro	Gly	Arg	Phe	Glu	Arg	Ile	Leu	Leu	Arg	Ala
	195					200						205			
Ala	Asn	Thr	His	Ser	Ser	Ala	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln	Ser	Ile	His
	210					215					220				
Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Phe	Val	Asn
225					230					235					240
Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Ser	Phe
				245					250					255	
Gly	Leu	Leu	Lys	Leu											
			260												

<210> 27
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> *Equus*

5

<220>
 <223> TMZ-CD154 de caballo

10

	<400>	27														
Ala	Thr	Met	Arg	Met	Lys	Gln	Ile	Glu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu	
1				5					10					15		
Ser	Lys	Ile	Tyr	His	Ile	Glu	Asn	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu	
			20					25					30			
Ile	Gly	Glu	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu	
		35					40					45				
Thr	Val	Phe	Leu	Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val	
	50					55					60					
Tyr	Leu	His	Arg	Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	His	
65					70					75				80		
Glu	Asp	Phe	Val	Phe	Met	Lys	Thr	Ile	Gln	Arg	Cys	Asn	Lys	Gly	Glu	
				85					90					95		
Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Arg	Ser	Gln	Phe	Glu	
		100						105					110			
Gly	Phe	Val	Lys	Asp	Ile	Met	Leu	Asn	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Lys	Gly	
		115					120						125			
Glu	Asn	Phe	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Glu	Pro	Gln	Ile	Ala	Ala	
	130					135					140					
His	Val	Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Thr	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	
145					150					155					160	
Ala	Gln	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	
			165						170					175		
Asn	Gly	Lys	Gln	Leu	Ala	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	
			180					185						190		

ES 2 744 479 T3

Ala Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Gly Gln Ala Pro
 195 200 205
 Phe Ile Ala Ser Leu Cys Leu Arg Ser Val Ser Gly Ser Glu Arg Ile
 210 215 220
 Leu Leu Arg Ala Ala Asn Thr His Ser Ser Ser Lys Pro Cys Gly Gln
 225 230 235 240
 Gln Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser
 245 250 255
 Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Glu Val Ser His Gly Thr Gly
 260 265 270
 Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 275 280

<210> 28
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> *Canis lupus familiaris*

5

<220>
 <223> TMZ-CD154 de perro

10

<400> 28
 Ala Thr Met Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu
 1 5 10 15
 Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu
 20 25 30
 Ile Gly Glu Arg Gly Gly Arg Gly Gly Ile Phe Met Tyr Leu Leu
 35 40 45
 Thr Val Phe Leu Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val
 50 55 60
 Tyr Leu His Arg Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Phe Met Lys Thr Leu Gln Lys Cys Asn Lys Gly Glu
 85 90 95
 Gly Ser Leu Ser Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu
 100 105 110
 Ala Phe Leu Lys Glu Ile Met Leu Asn Asn Glu Met Lys Lys Glu Glu
 115 120 125
 Asn Ile Ala Met Gln Lys Gly Asp Gln Asp Pro Arg Ile Ala Ala His
 130 135 140
 Val Ile Ser Glu Ala Ser Ser Asn Pro Ala Ser Val Leu Arg Trp Ala
 145 150 155 160
 Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Ile Ser Ser Asn Leu Val Ser Leu Glu Asn
 165 170 175
 Gly Lys Gln Leu Ala Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Val Tyr Ala
 180 185 190
 Gln Val Thr Phe Cys Ser Asn Arg Ala Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe
 195 200 205
 Val Ala Ser Leu Cys Leu His Ser Pro Ser Gly Thr Glu Arg Val Leu
 210 215 220
 Leu Arg Ala Ala Ser Ser Arg Gly Ser Ser Lys Pro Cys Gly Gln Gln
 225 230 235 240
 Ser Ile His Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu His Pro Gly Ala Ser Val
 245 250 255
 Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe
 260 265 270
 Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu
 275 280

<210> 29
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> *Felis catus*

15

<220>

<223> TMZ-CD154 de gato

5

<400> 29

Ala	Thr	Met	Arg	Met	Lys	Gln	Ile	Glu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Ile	Leu
1				5					10					15	
Ser	Lys	Ile	Tyr	His	Ile	Glu	Asn	Glu	Ile	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Leu
			20					25					30		
Ile	Gly	Glu	Arg	Gly	Gly	Arg	Gly	Gly	Gly	Ile	Phe	Met	Tyr	Leu	Leu
		35				40						45			
Thr	Val	Phe	Leu	Ile	Thr	Gln	Met	Ile	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Ala	Val
	50					55					60				
Tyr	Leu	His	Arg	Arg	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Tyr
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Val	Phe	Met	Lys	Thr	Leu	Gln	Lys	Cys	Asn	Lys	Gly	Glu
				85					90					95	
Gly	Ala	Leu	Ser	Leu	Leu	Asn	Cys	Glu	Glu	Ile	Lys	Ser	Arg	Phe	Glu
			100					105					110		
Ala	Phe	Leu	Lys	Glu	Ile	Met	Leu	Asn	Lys	Glu	Thr	Lys	Lys	Glu	Lys
			115				120						125		
Asn	Val	Ala	Met	Gln	Lys	Gly	Asp	Gln	Asp	Pro	Arg	Val	Ala	Ala	His
	130					135					140				
Val	Ile	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Val	Leu	Gln	Trp	Ala
145					150					155					160
Pro	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Asn
				165					170					175	
Gly	Lys	Gln	Leu	Ala	Val	Lys	Arg	Gln	Gly	Leu	Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Ala
			180					185					190		
Gln	Val	Thr	Phe	Cys	Ser	Asn	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Phe
		195					200					205			
Ile	Ala	Ser	Leu	Cys	Leu	His	Ser	Pro	Ser	Gly	Ser	Glu	Arg	Val	Leu
	210					215					220				
Leu	Arg	Ala	Ala	Asn	Ala	Arg	Ser	Ser	Ser	Lys	Pro	Cys	Gly	Gln	Gln
225				230						235					240
Ser	Ile	His	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Glu	Leu	His	Pro	Gly	Ala	Ser	Val
				245				250						255	
Phe	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Pro	Ser	Gln	Val	Ser	His	Gly	Thr	Gly	Phe
			260					265					270		
Thr	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Lys	Leu								
		275					280								

REIVINDICACIONES

1. Secuencia de nucleótidos que codifica para, desde 5' hasta 3', una proteína transmembrana

OD - (L) -TD - ED

en la que

OD es un dominio de oligomerización seleccionado del grupo que consiste en una cremallera de isoleucina y un dominio de trimerización de fibritina T4,
 L es un ligador, que está presente opcionalmente,
 TD es un dominio transmembrana derivado de CD154 o de cualquier proteína transmembrana tipo II, y
 ED es un dominio extracelular de CD154

con la condición de que la secuencia de nucleótidos no comprenda SEQ ID NO: 16, es decir una secuencia que puede codificar para la región intracelular de CD154, ni la región intracelular de CD40.
2. Nucleótido según la reivindicación 1, en el que ED, la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 que codifica para el dominio extracelular de CD154, se selecciona de
 - i) SEQ ID NO: 11, es decir residuos 199-846 de SEQ ID NO: 1,
 - ii) SEQ ID NO: 11, es decir residuos 199-846 de SEQ ID NO: 1, pero en la que uno o más de los residuos de ácido nucleico 397-420 de SEQ ID NO: 1 se han deletado o intercambiado con otro ácido nucleico para evitar la escisión de la molécula,
 - iii) SEQ ID NO: 12, es decir residuos 127-846 de SEQ ID NO: 3,
 - iv) SEQ ID NO: 13, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 4,
 - v) SEQ ID NO: 14, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 5,
 - vi) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 98% o el 99% con una secuencia definida en cualquiera de i)-v), o
 - vi) un dominio extracelular de CD154 correspondiente de un mamífero.
3. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 ó 2, en la que TD, la porción de la secuencia de nucleótidos que puede codificar para el dominio transmembrana, se deriva de cualquiera de las secuencias de nucleótidos que pueden codificar para CD154, ligando OX40 humano o CD70 humano, y la secuencia de nucleótidos tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con
 - i) SEQ ID NO: 17, es decir residuos 127-198 de SEQ ID NO: 1,
 - ii) SEQ ID NO: 20, es decir dominio transmembrana de ligando OX40 humano, o
 - iii) SEQ ID NO: 22, es decir dominio transmembrana de CD70 humano.
4. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que OD, la secuencia de nucleótidos que puede codificar para el dominio de oligomerización, es la cremallera de isoleucina que tiene SEQ ID NO: 23, es decir residuos 10-108 de SEQ ID NO: 1.
5. Secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
6. Combinación de una secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones anteriores y una secuencia de nucleótidos que puede codificar para un inmunomodulador.
7. Combinación según la reivindicación 6, en la que la secuencia de nucleótidos que puede codificar para un inmunomodulador es un gen de ligando de 4-1BB, o un gen para un fragmento variable de cadena sencilla anti-IL6R (scFv).
8. Combinación según la reivindicación 7, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 98% o el 100% con SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.
9. Proteína que comprende la estructura

OD-(L)-TD-ED,

en la que

OD es una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio de oligomerización seleccionado del grupo que consiste en una cremallera de isoleucina y un dominio de trimerización

de fibrina T4,
 L es un ligador, que está presente opcionalmente,
 TD es una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio transmembrana, y
 ED es una secuencia de aminoácidos correspondiente a un dominio extracelular de CD154,

- 5 con la condición de que la secuencia de aminoácidos no comprenda SEQ ID NO: 15, es decir la región intracelular de CD154, ni la región intracelular de CD40.
- 10 10. Proteína según la reivindicación 9, en la que el dominio extracelular de CD154 se selecciona de
- 15 i) SEQ ID NO: 24,
 ii) SEQ ID NO: 24, pero en la que uno o más de los aminoácidos de la secuencia de aminoácidos MQKGDQNP correspondiente a los residuos de nucleótido 397-420 de SEQ ID NO: 1 se han delecionado o intercambiado con otro aminoácido para evitar la escisión de la molécula,
 20 iii) residuos de aminoácido correspondientes a los nucleótidos de SEQ ID NO: 12, es decir residuos 127-846 de SEQ ID NO: 3,
 iv) residuos de aminoácido correspondientes a los nucleótidos de SEQ ID NO: 13, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 4,
 v) residuos de aminoácido correspondientes a los nucleótidos de SEQ ID NO: 14, es decir residuos 127-844 de SEQ ID NO: 5,
 vi) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95%, el 98% o el 99% con una secuencia definida en cualquiera de i)-v), o
 vi) un dominio extracelular de CD154 correspondiente de un mamífero.
- 25 11. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en la que ED tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% o al menos el 95% para SEQ ID NO: 24.
- 30 12. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que TD, el dominio transmembrana, se deriva del dominio transmembrana de CD154 o cualquier proteína transmembrana tipo II.
- 35 13. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en la que la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio transmembrana tiene al menos una identidad de secuencia del 90%, el 95%, el 98% o el 100% para SEQ ID NO: 18.
- 40 14. Proteína según la reivindicación 13, en la que los residuos 14 y/o 16 de SEQ ID NO: 18 se delecionan o sustituyen con otro aminoácido.
- 45 15. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-14, que tiene al menos una identidad de secuencia del 90%, el 95%, el 98% o el 100% con SEQ ID NO: 2.
- 50 16. Vehículo que comprende un nucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho vehículo se selecciona de plásmidos, vectores virales, transposones, células, células artificiales y vehículos artificiales.
- 55 17. Vehículo según la reivindicación 16, en forma de virus.
18. Vehículo según la reivindicación 17, en el que el virus es un virus de serotipo 5/35 adenoviral.
19. Vehículo según la reivindicación 17, en el que el virus es un virus de serotipo 5/35 adenoviral que tiene al menos una región/sitio de unión de promotor E2F en el sentido de 5' del gen E1A, un sitio Sp1 opcional en el sentido de 5' del gen E1A, una delección E1A Δ 24, delecciones E3 Δ 6.7K y/o Δ gp19K, y un casete transgénico con transgén/transgenes que incluye(n) pCMV insertado después de la región génica L5.
20. Vehículo según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, que comprende además gen de ligando de 4-1BB o un gen para fragmento variable de cadena sencilla anti-IL6R (scFv).
- 60 21. Adenovirus de serotipo 5/35 modificado que contiene un casete transgénico impulsado por el promotor CMV insertado después de la región génica L5 con los transgenes humanos para un ligando CD40 unido a membrana tal como se define en SEQ ID NO: 1 y 4-1BBL de longitud completa y además
- 65 i) que tiene sitios de promotor E2F en el sentido de 5' del gen E1A,
 ii) que contiene un sitio Sp-1 en el sentido de 5' del gen E1A,
 iii) una delección E1A Δ 24, y
 iii) E3 Δ 6.7K/gp19K.
22. Secuencia de nucleótidos o combinación de secuencias de nucleótidos según cualquiera de las

reivindicaciones 1-5, o proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, o vehículo o combinación de vehículos según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, o adenovirus transgénico según la reivindicación 20, para su uso en medicina.

- 5 23. Secuencia de nucleótidos o combinación de secuencias de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, o vehículo o combinación de vehículos según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, o adenovirus transgénico según la reivindicación 20, para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad linfoproliferativa, inflamación, inflamación crónica, autoinmunidad y alergia.
- 10
24. Secuencia de nucleótidos o combinación de secuencias de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o proteína según cualquiera de las reivindicaciones 9-15, o vehículo o combinación de vehículos según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, o adenovirus transgénico según la reivindicación 20 en combinación con una sustancia farmacológica seleccionada de agentes anticancerígenos, inmunomoduladores, antivirales, quimioterápicos, citocinas, receptores de citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento o anticuerpos para su uso en medicina.
- 15

Figura 1

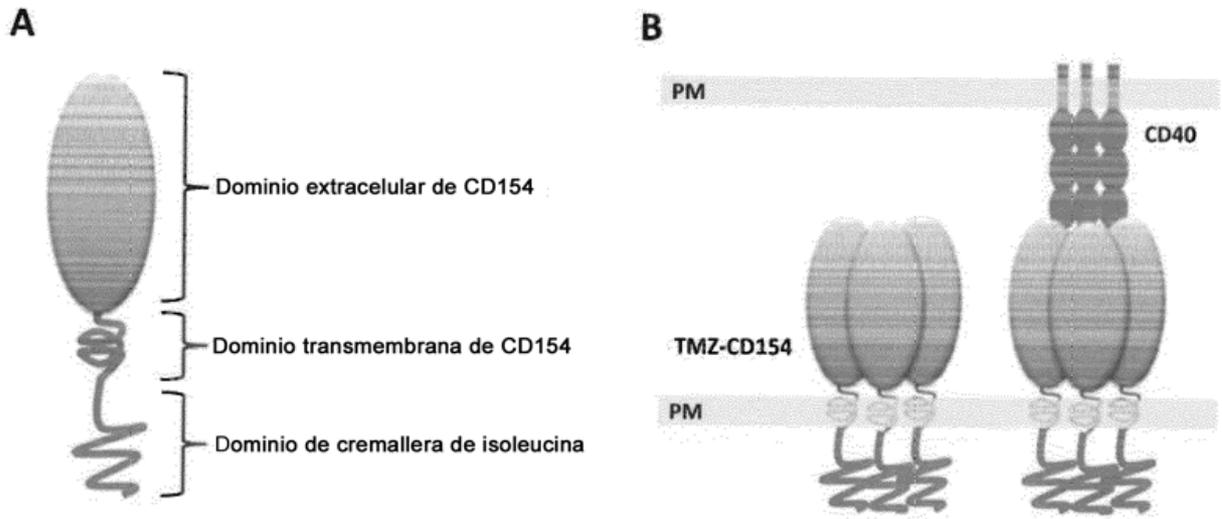


Figura 2

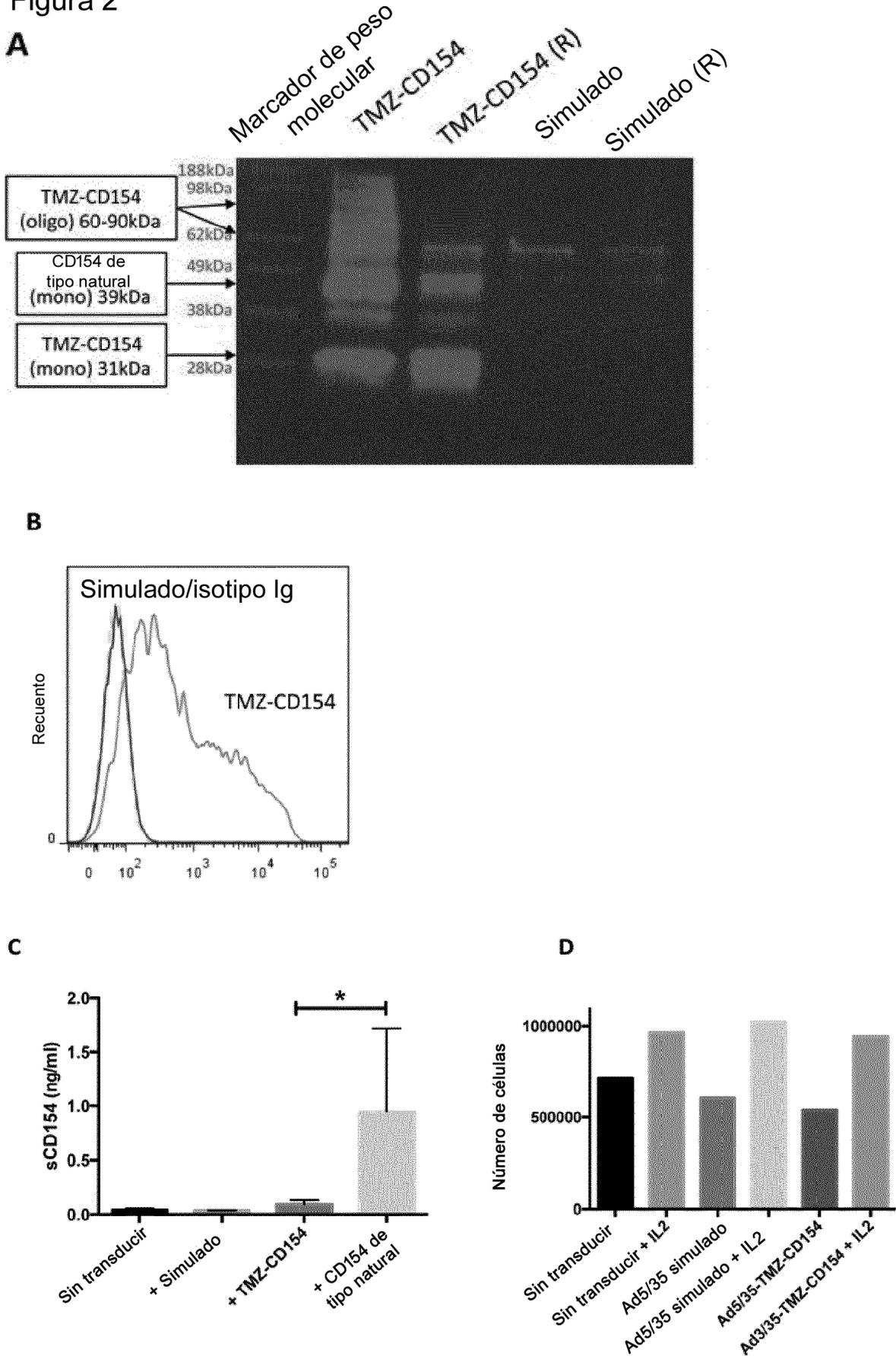


Figura 3

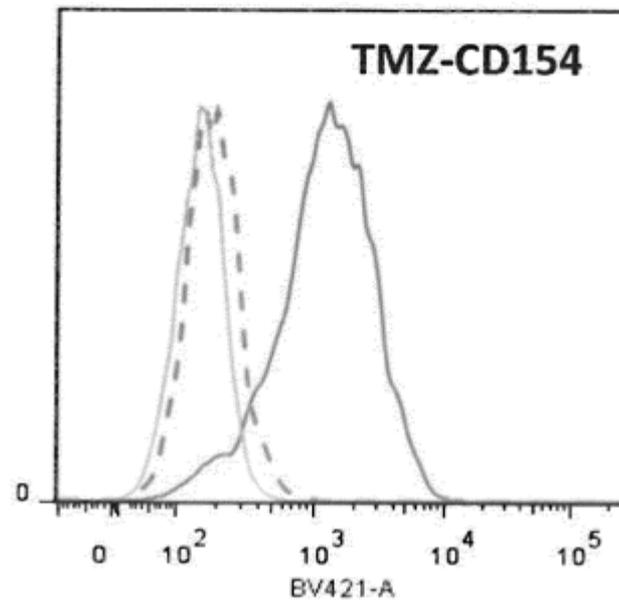
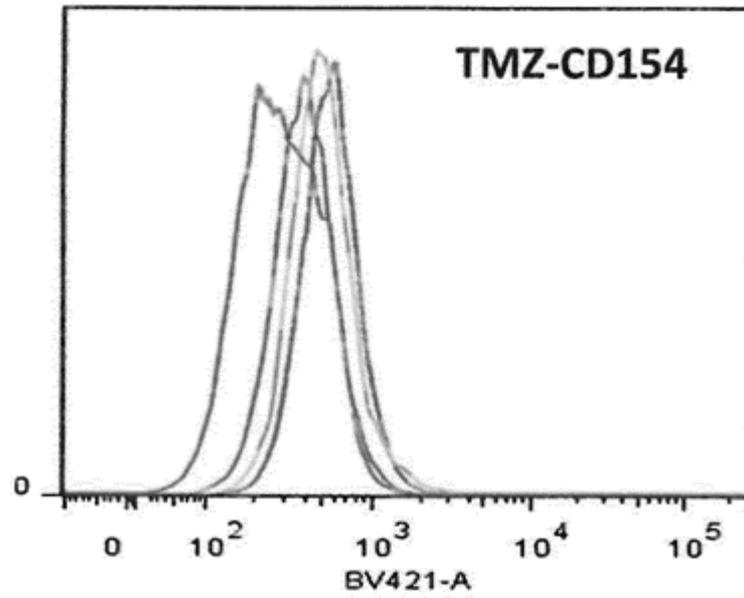


Figura 4

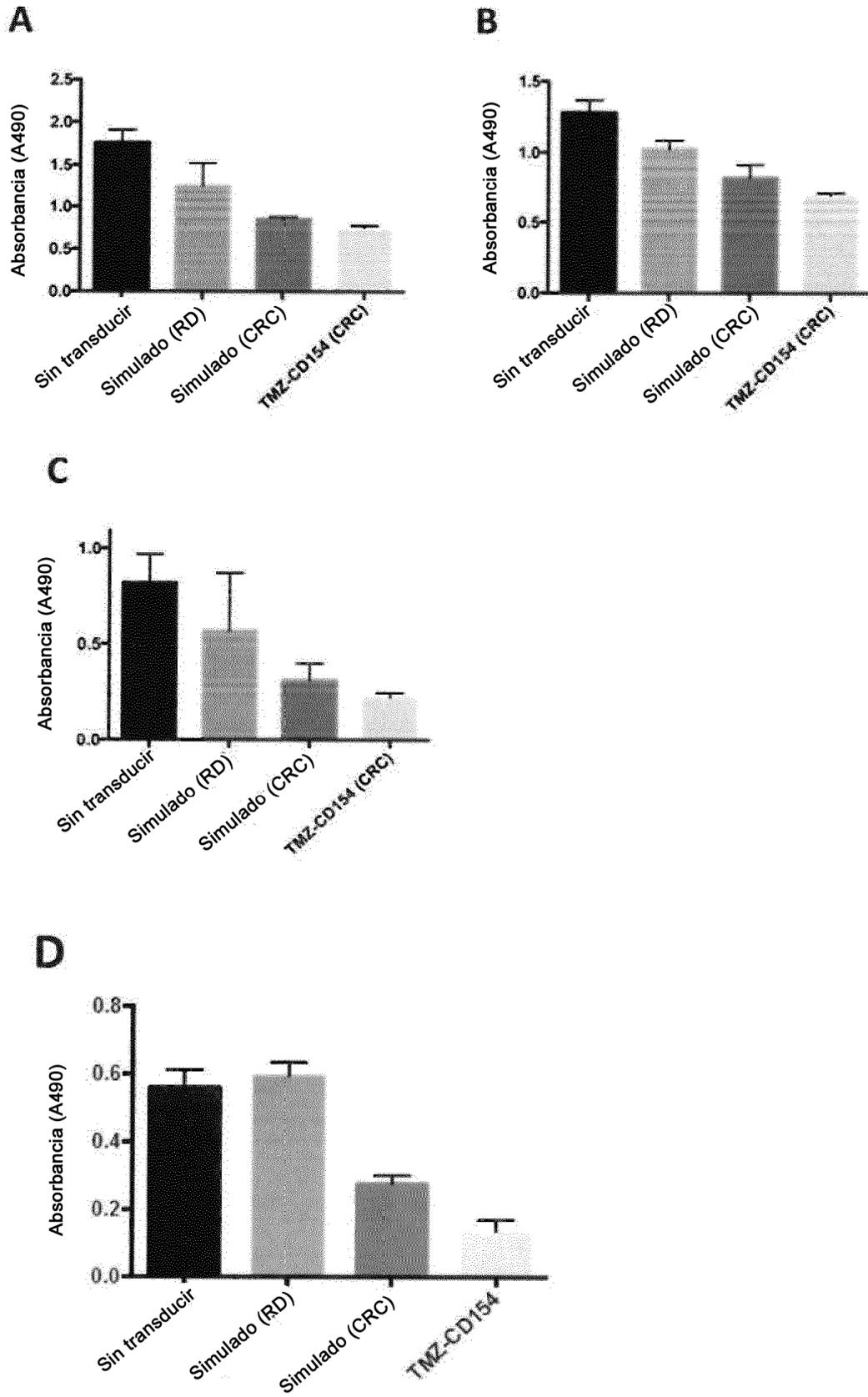


Figura 5

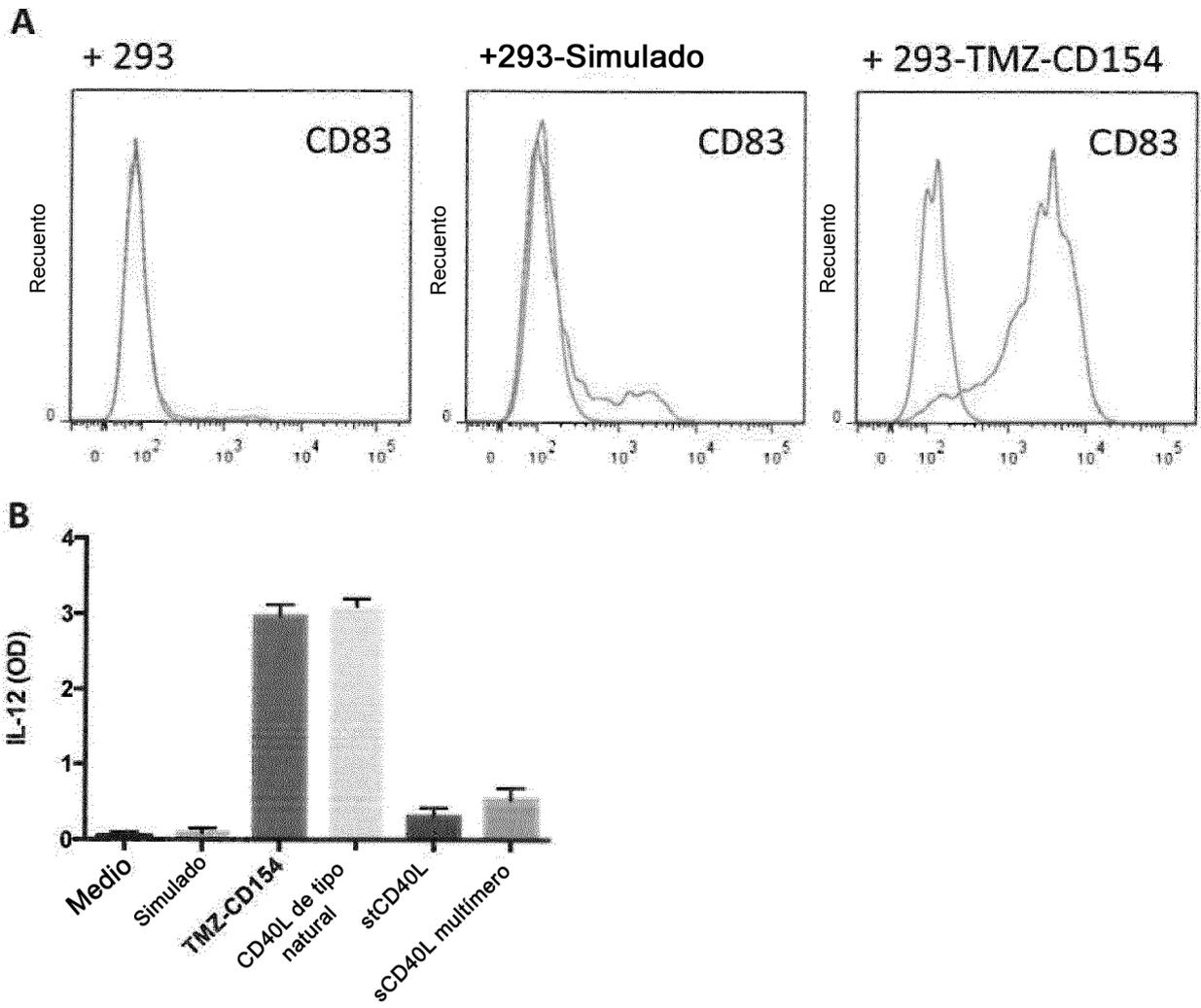


Figura 6

A

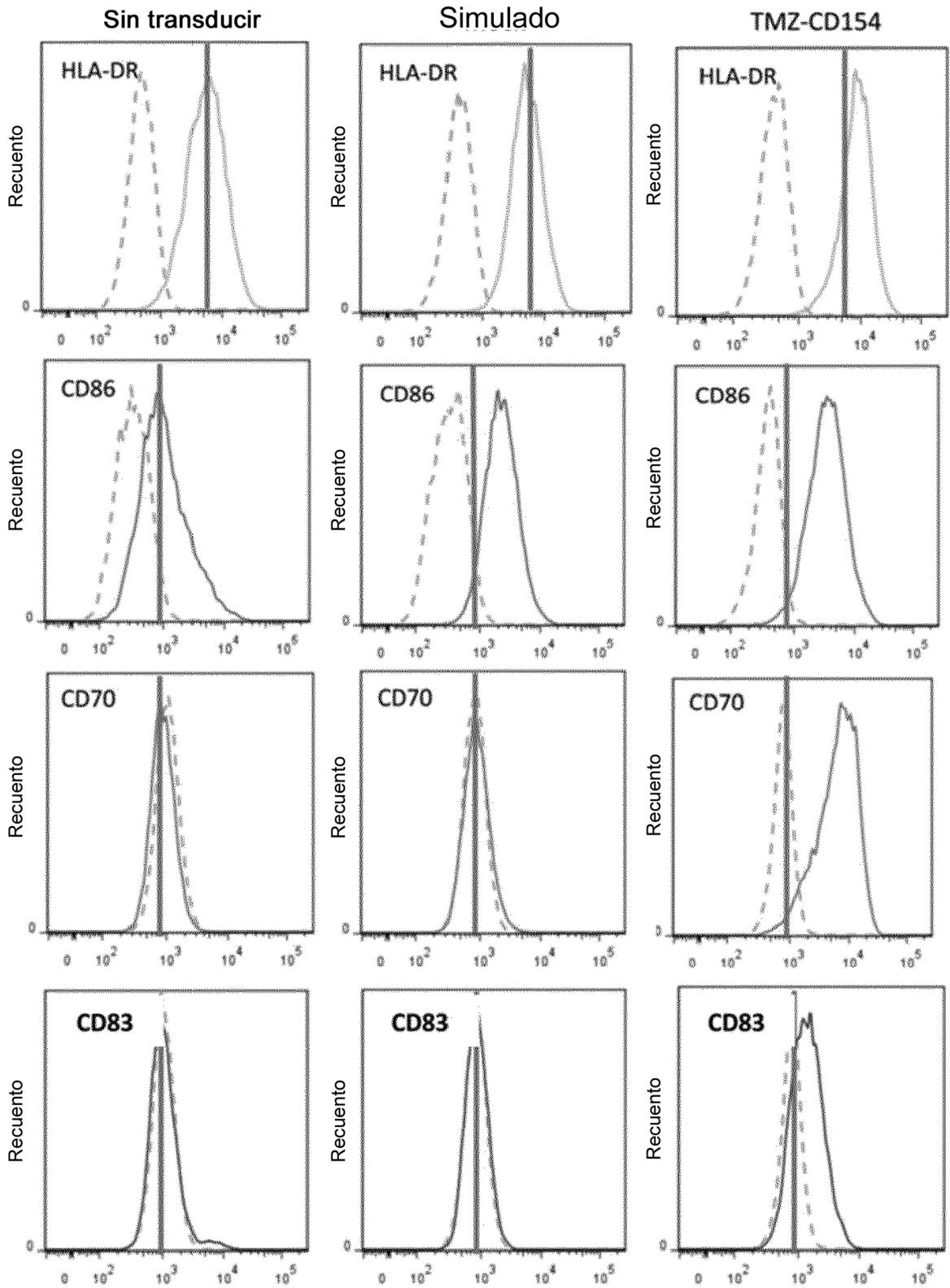


Figura 6

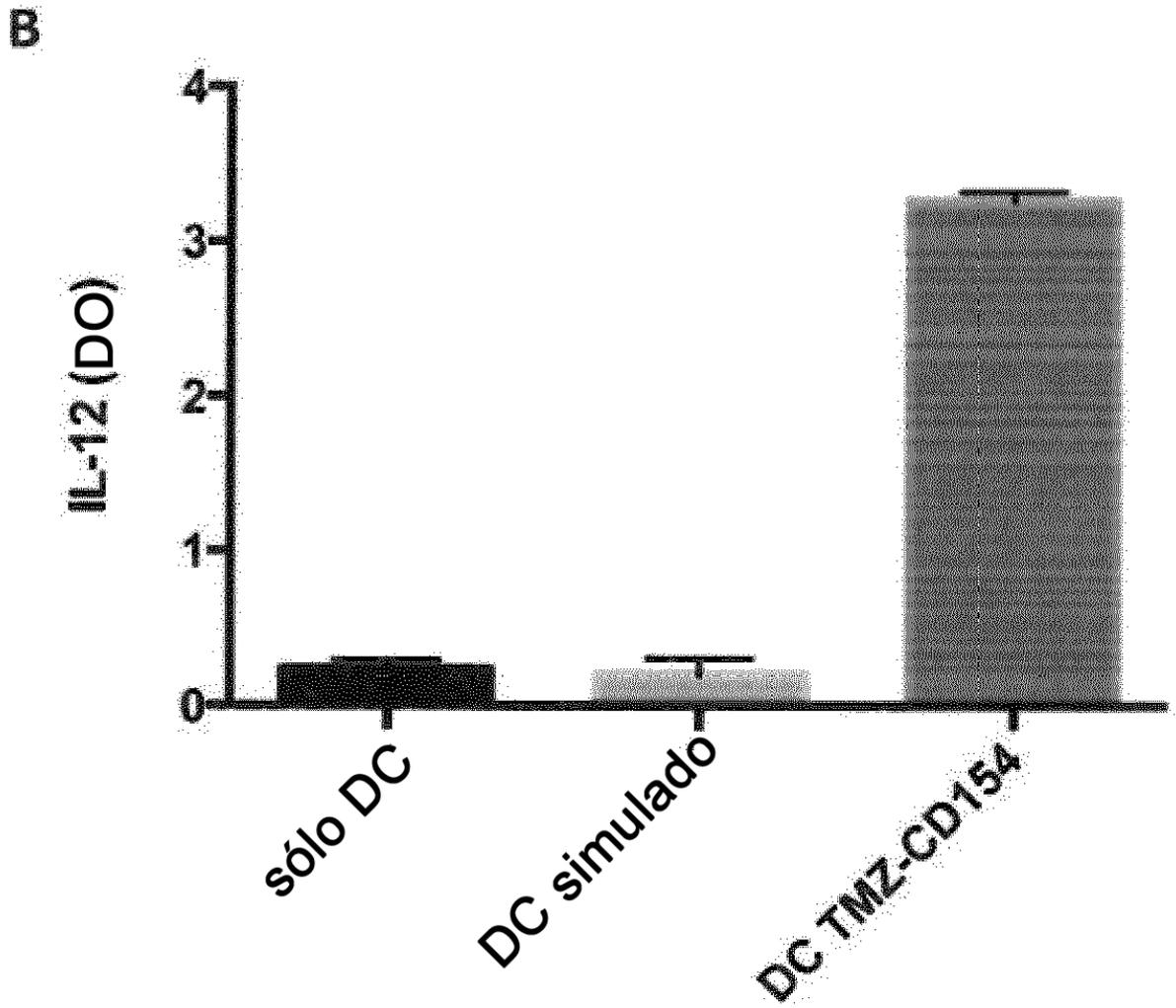


Figura 7

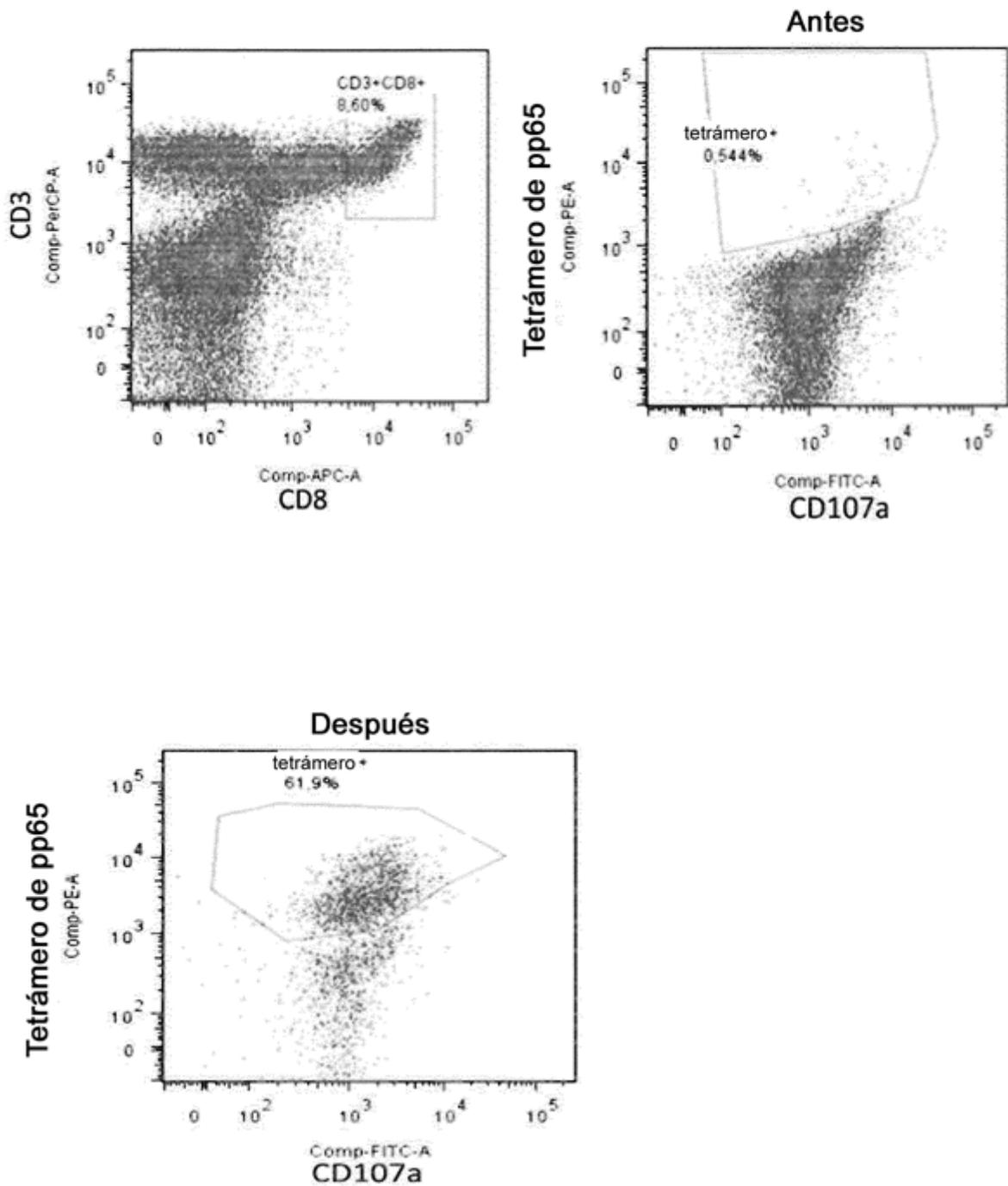
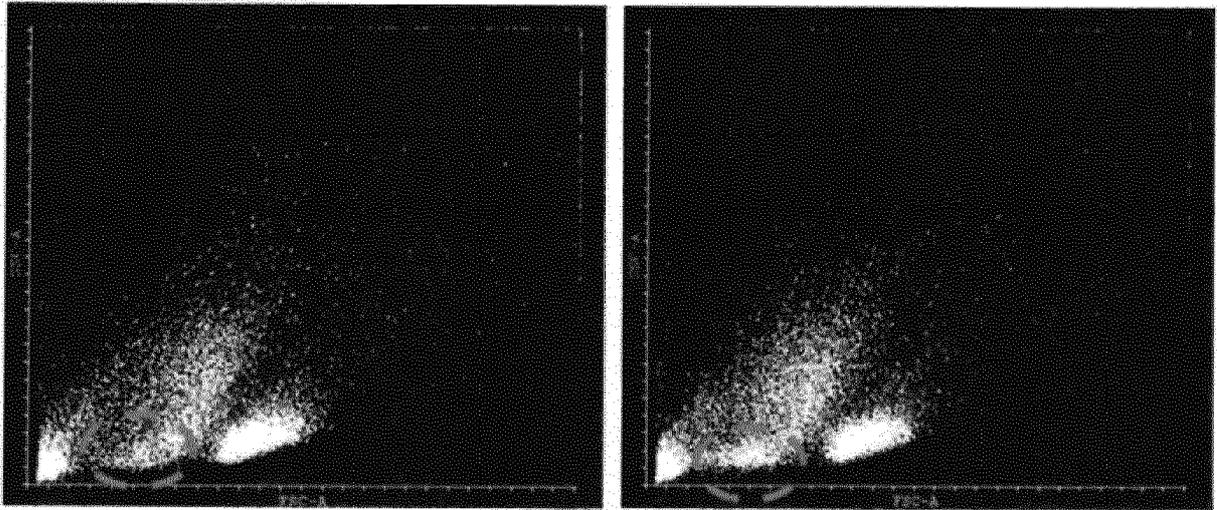


Figura 8

A



B

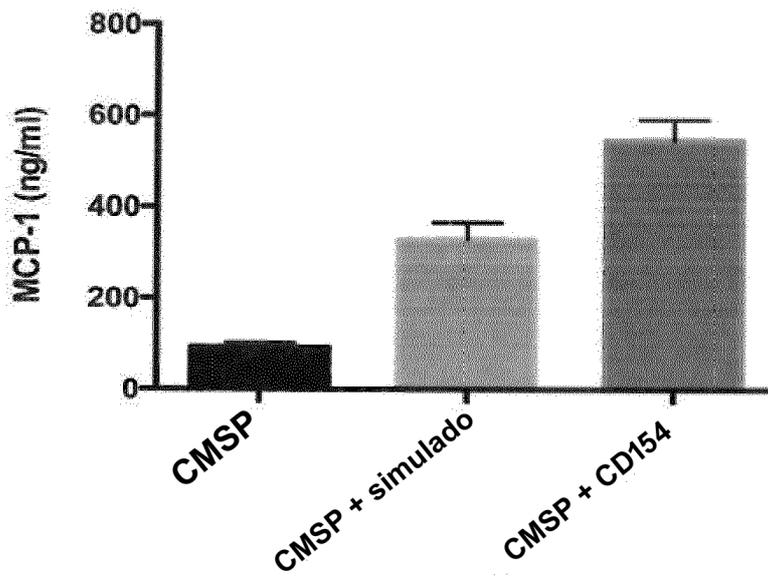


Figura 9

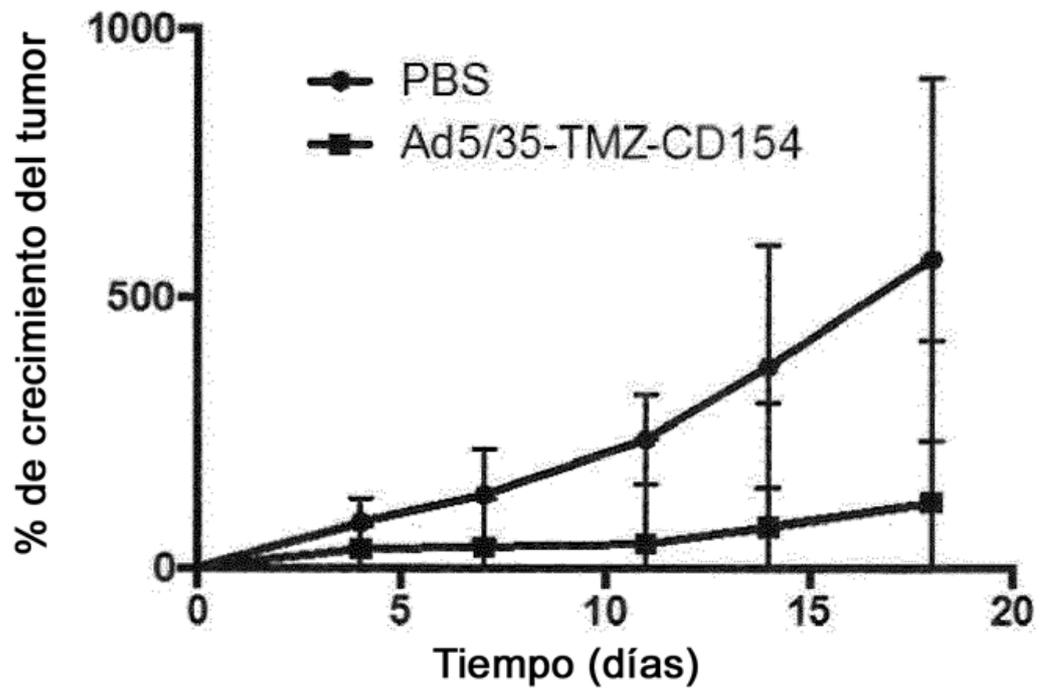


Figura 10

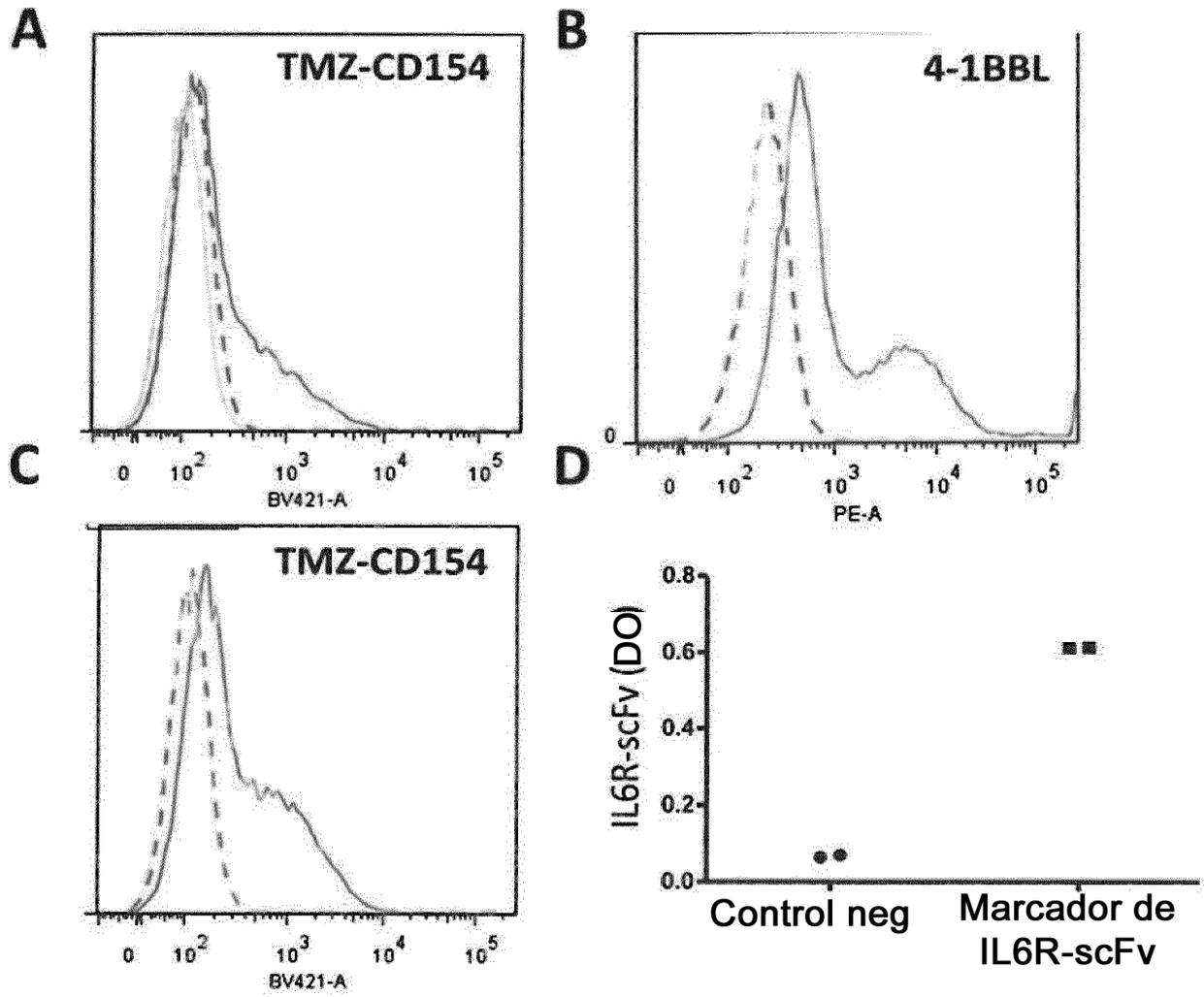


Figura 11

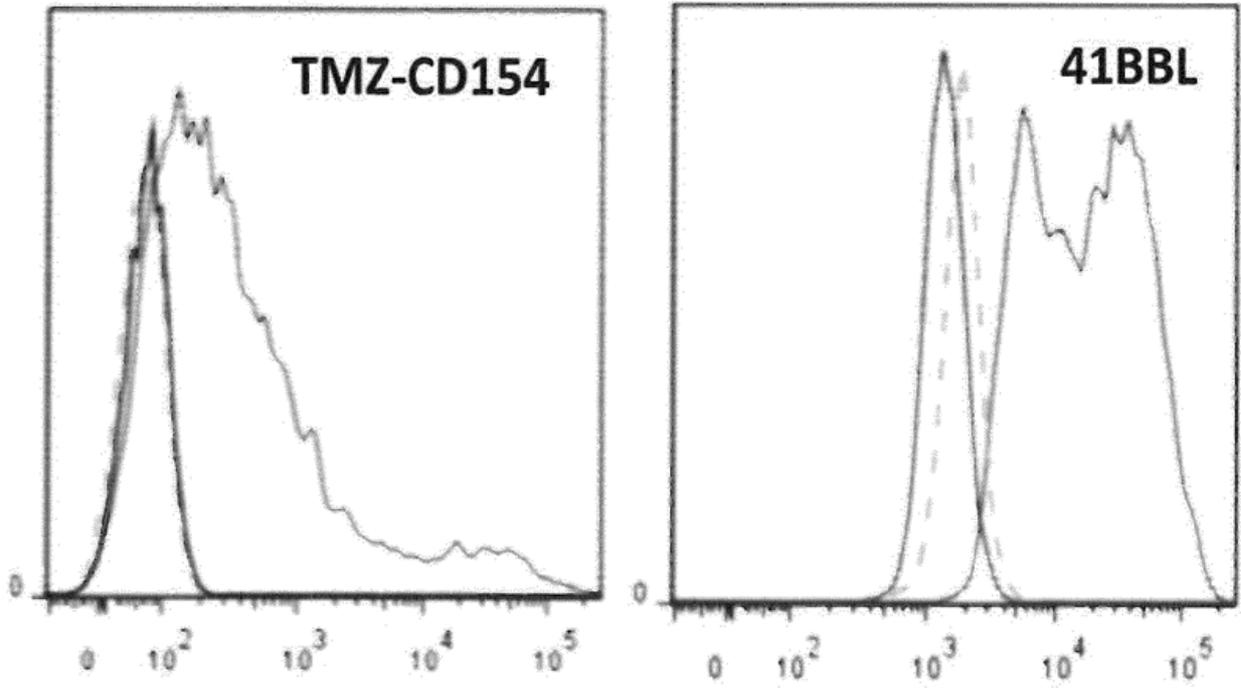


Figura 12

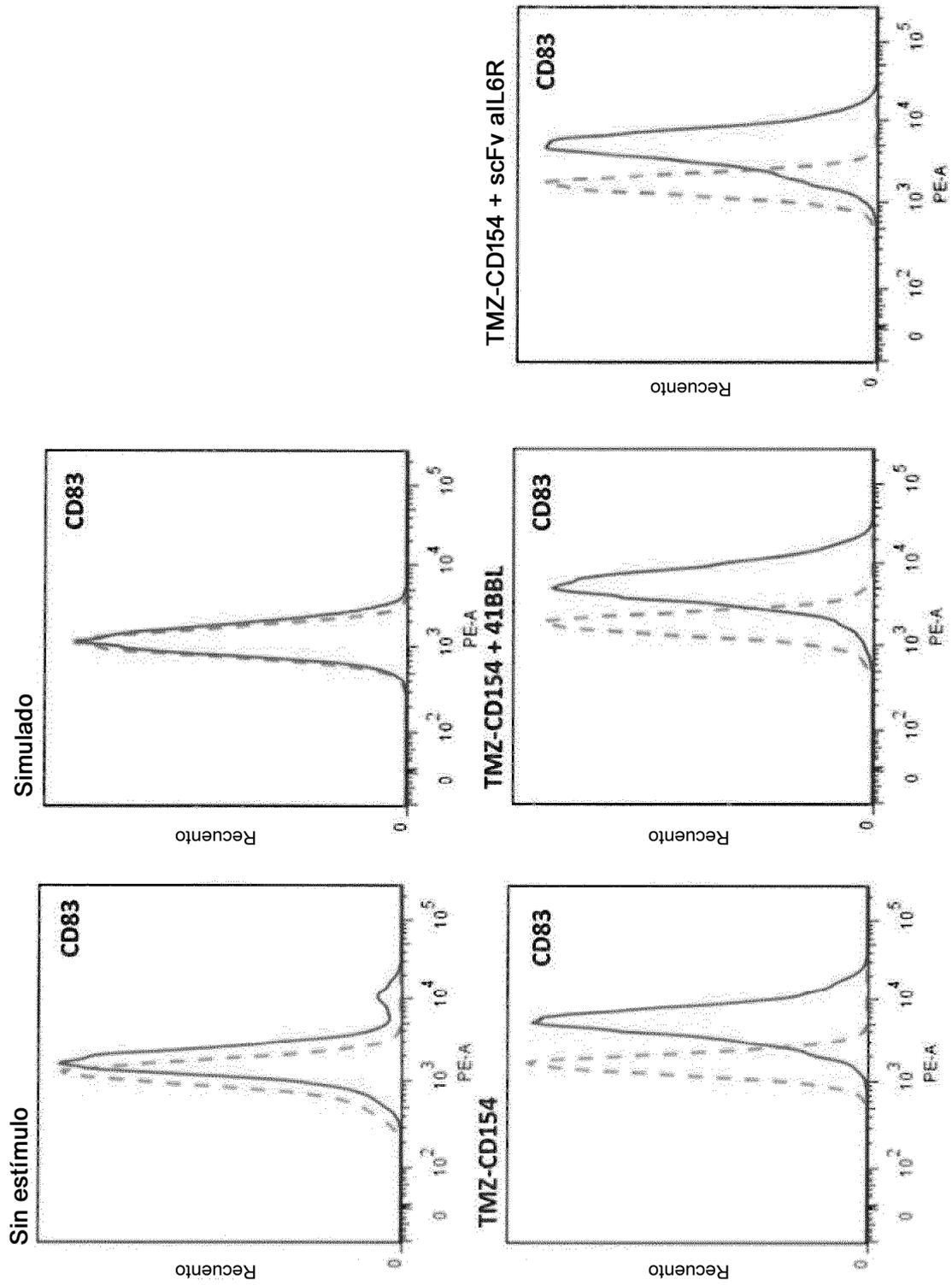


Figura 13

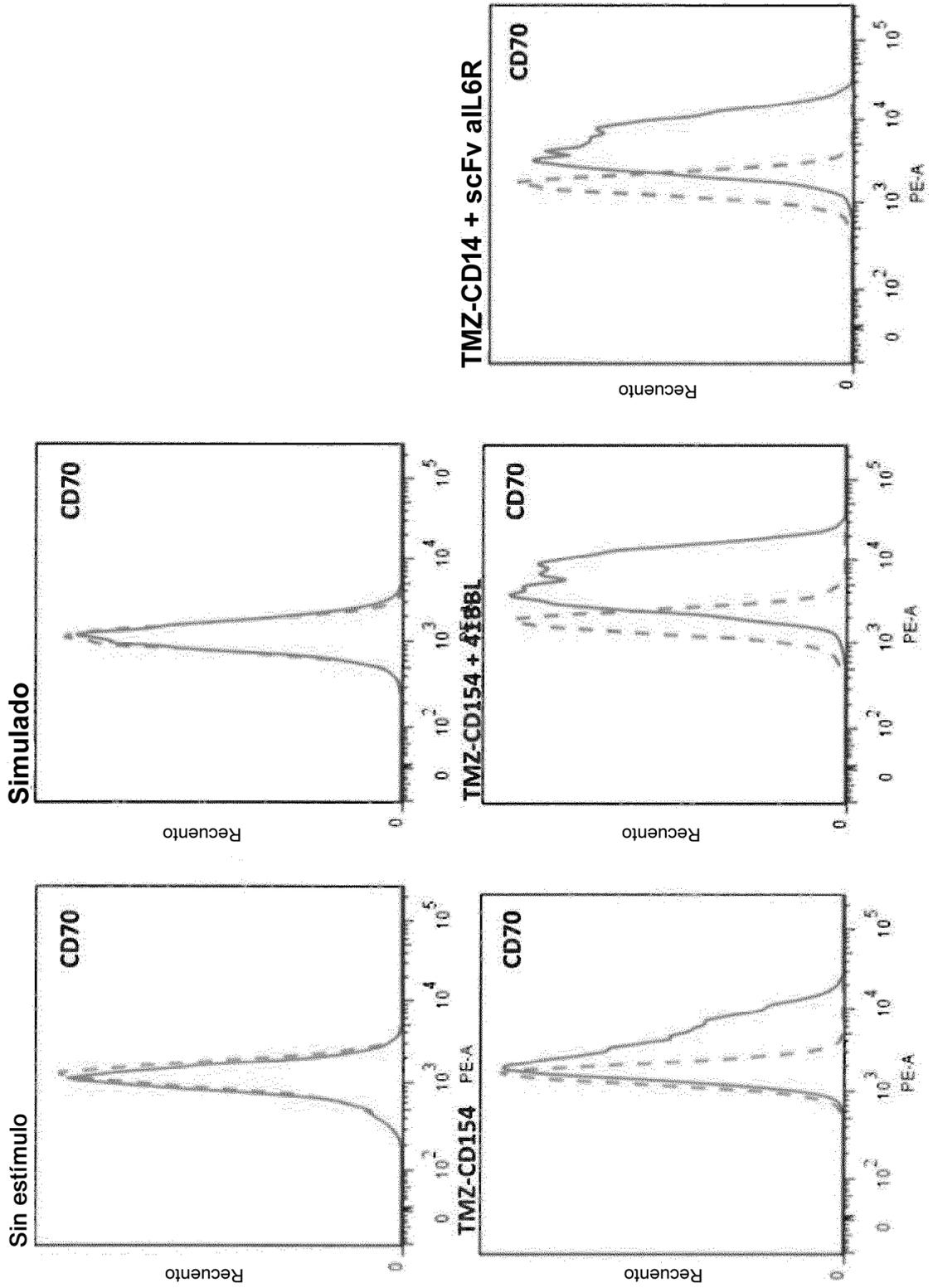


Figura 14

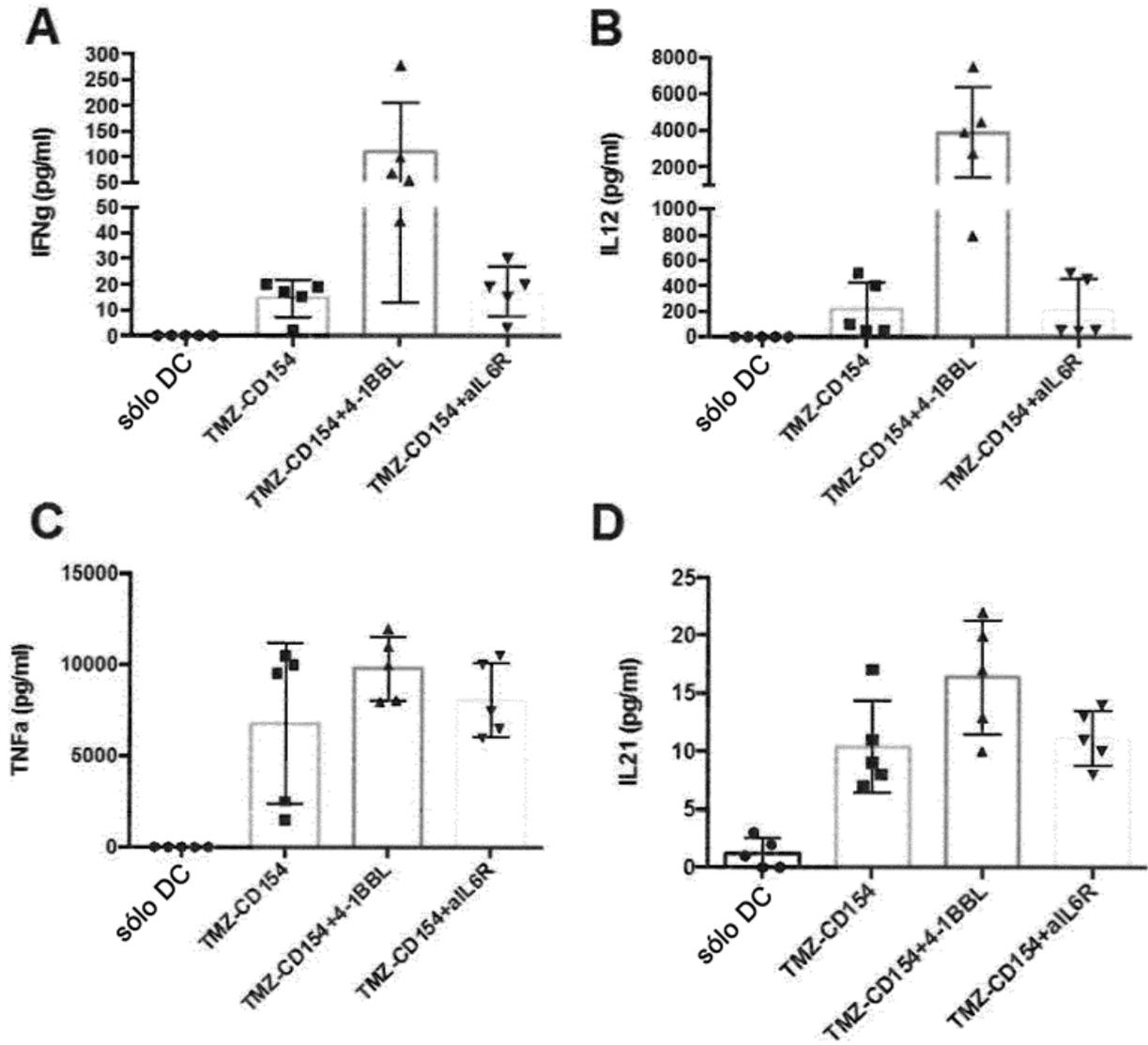
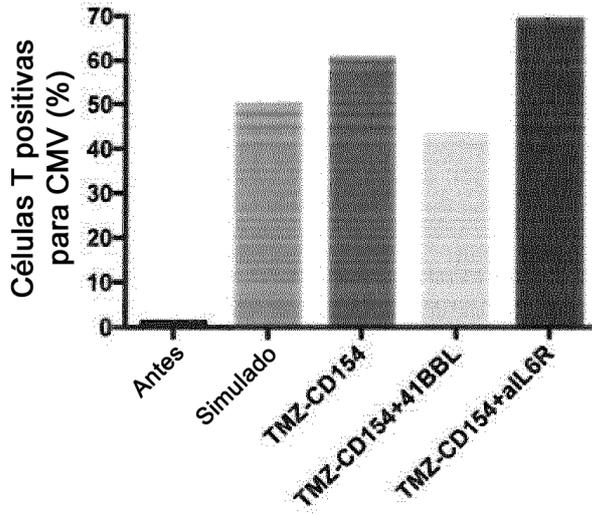
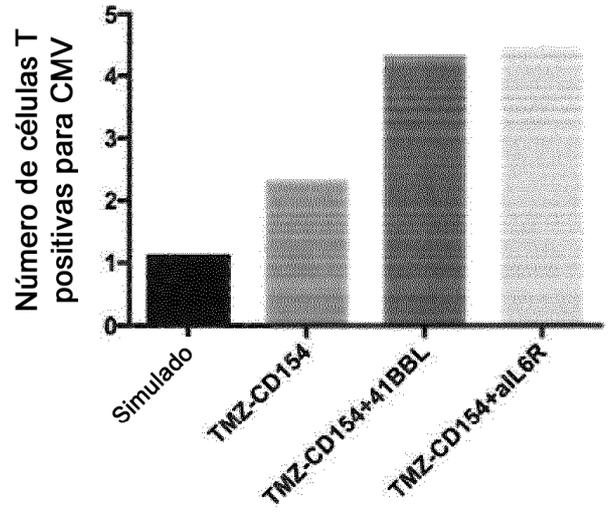


Figura 15

A



B



C

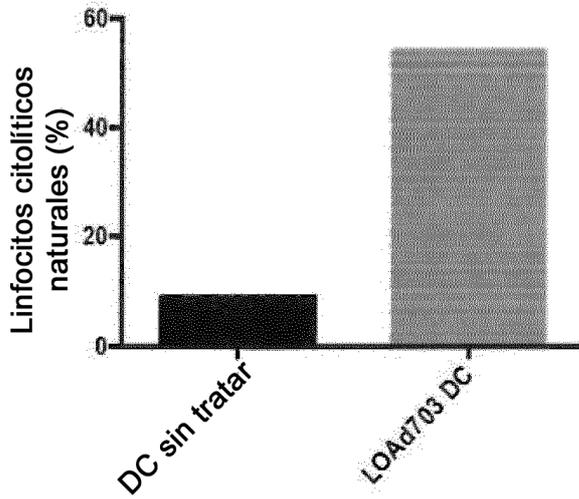
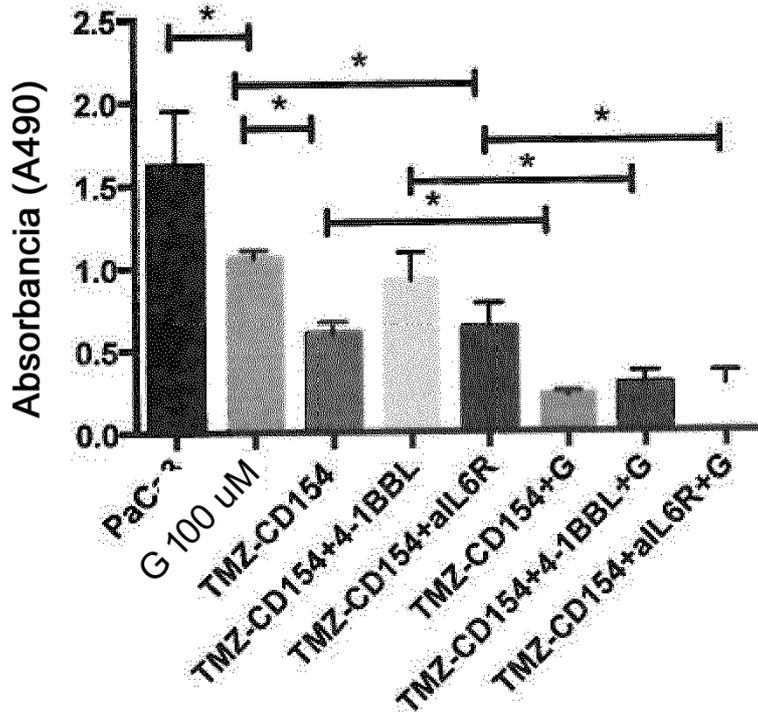


Figura 16

A



B

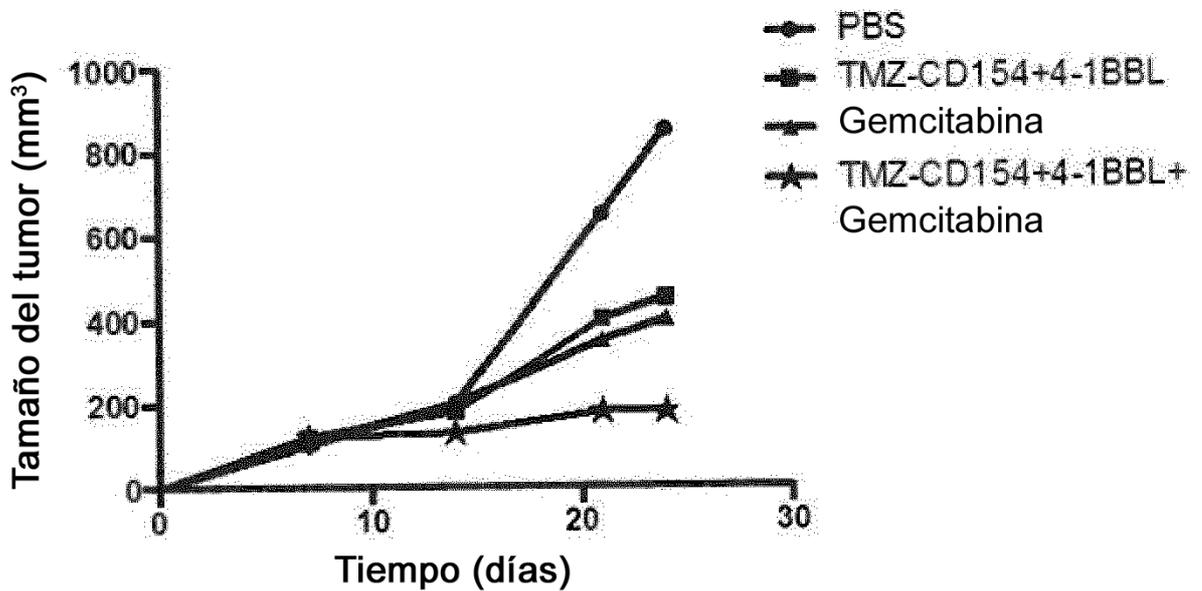


Figura 16

C

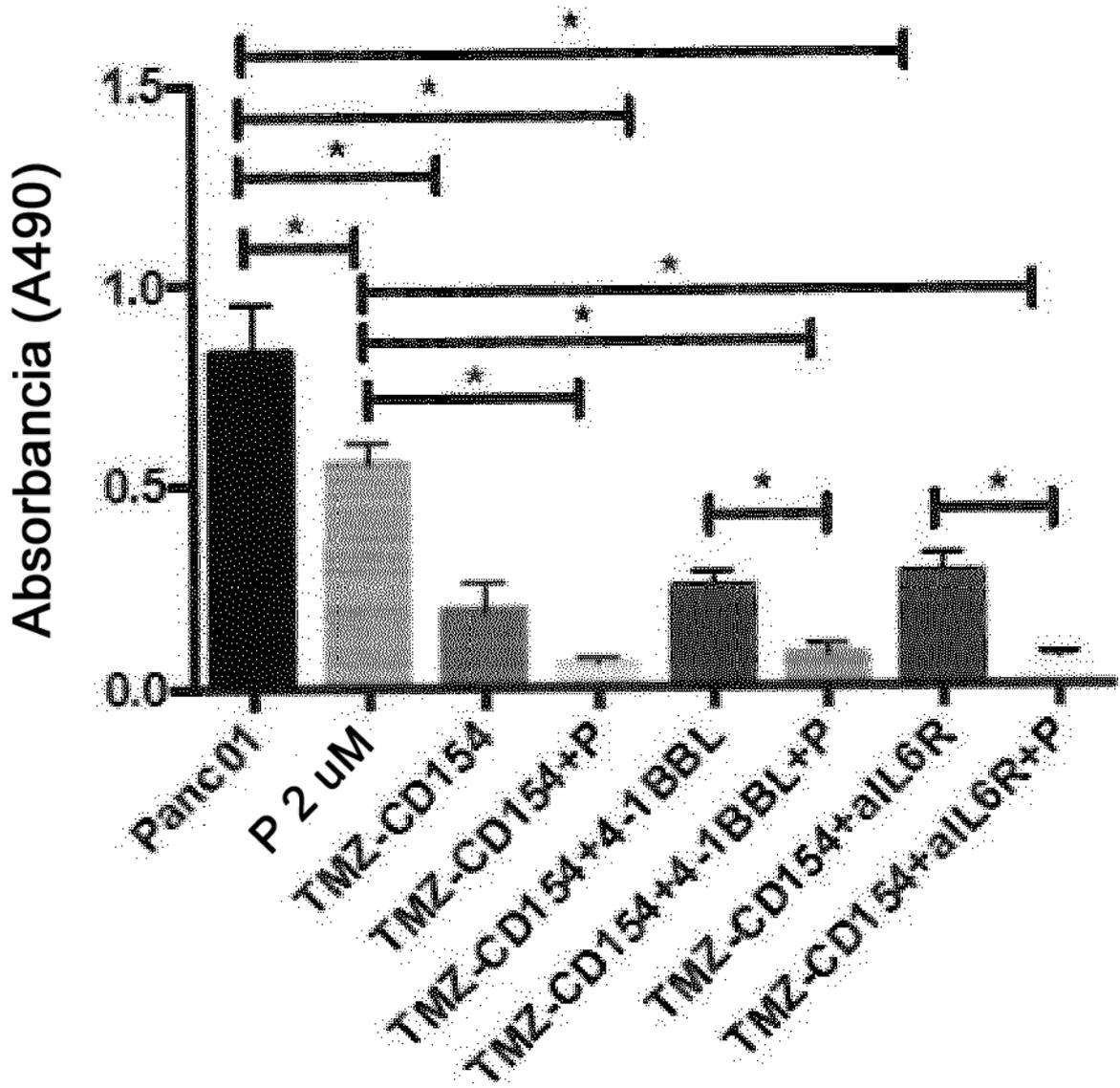


Figura 17

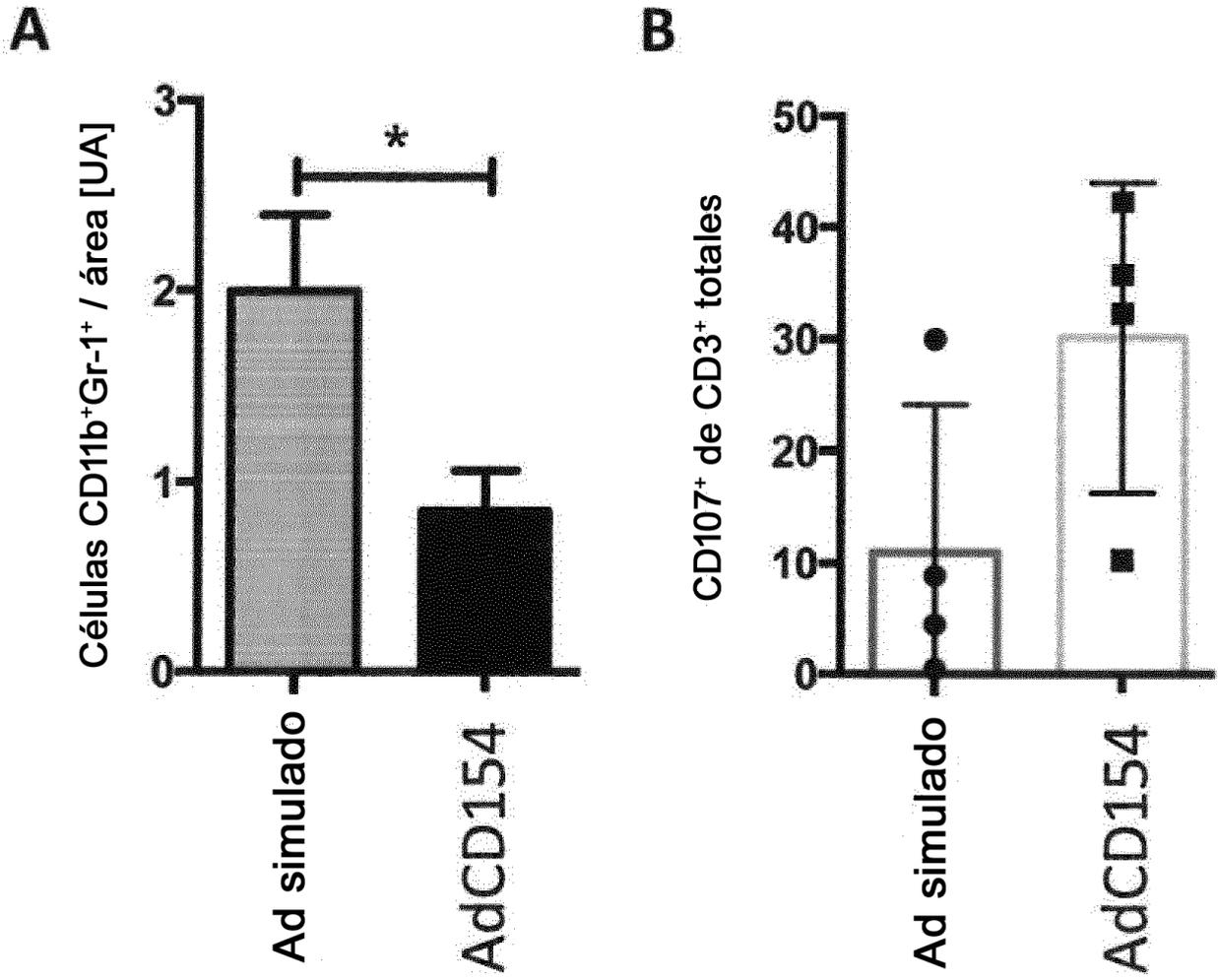


Figura 18

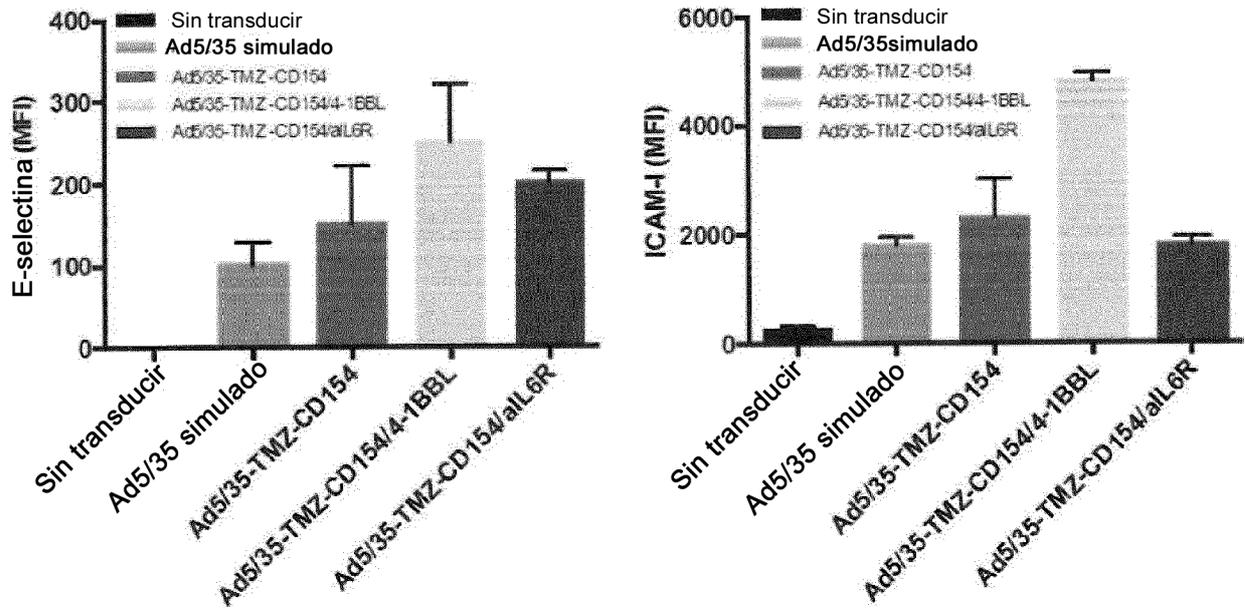


Figura 19

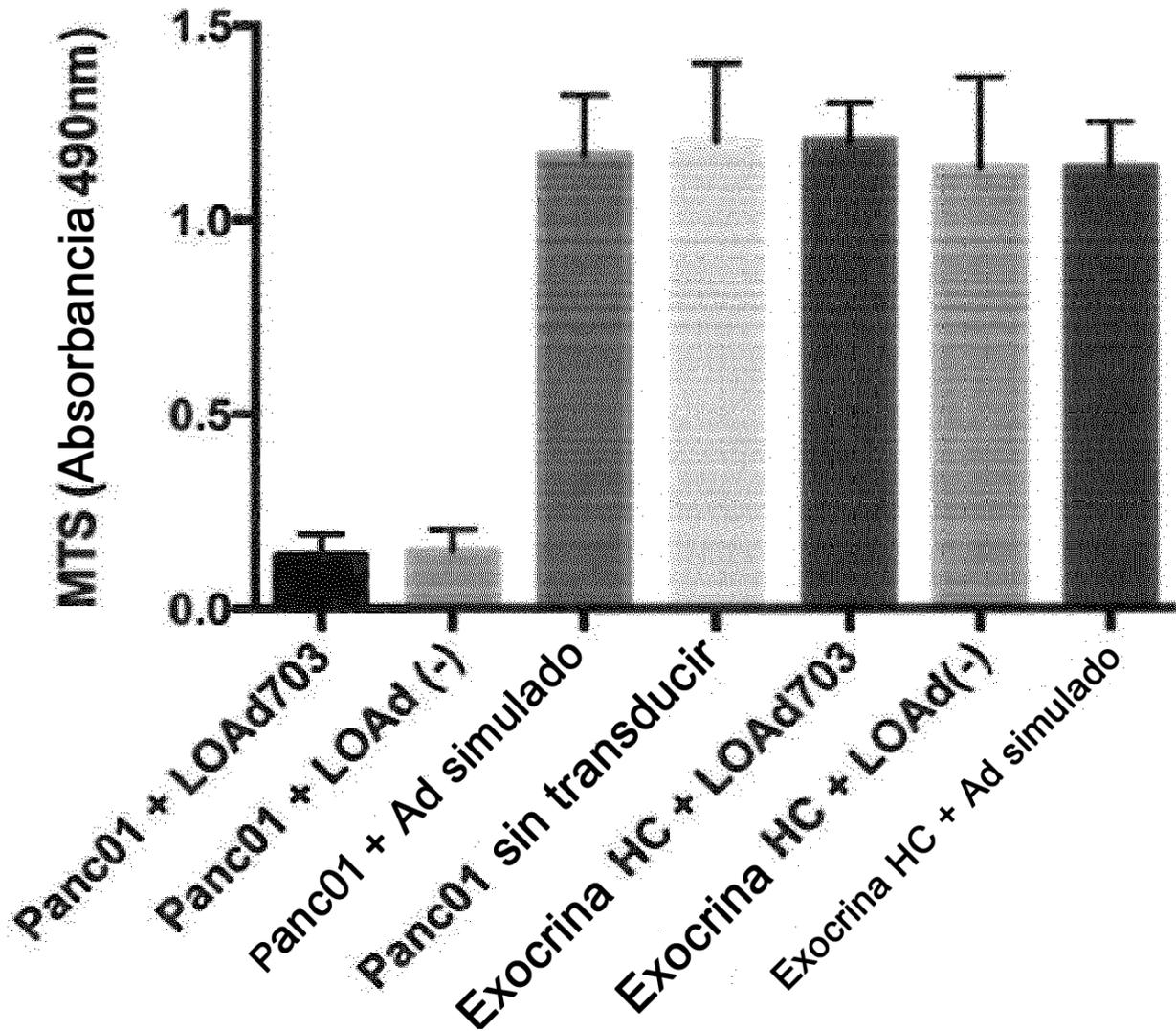


Figura 20

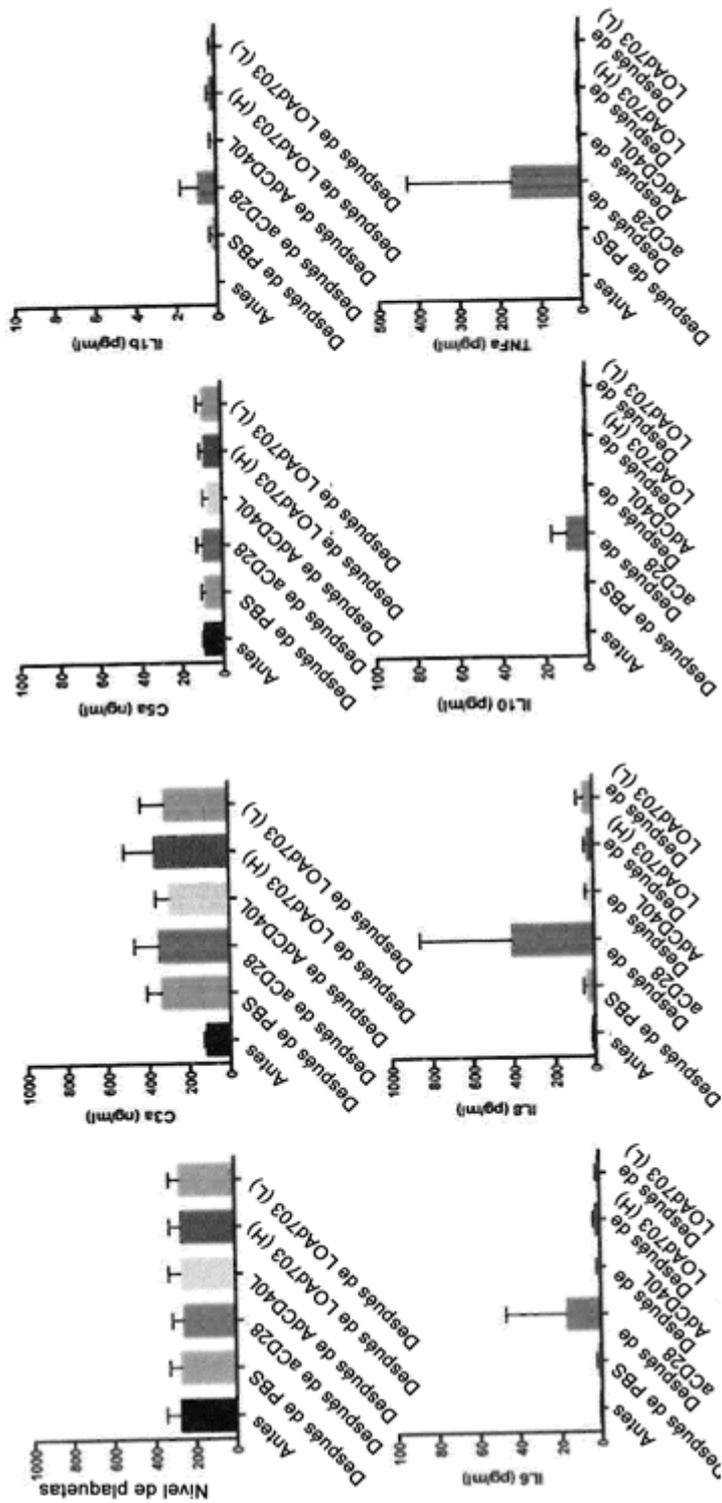
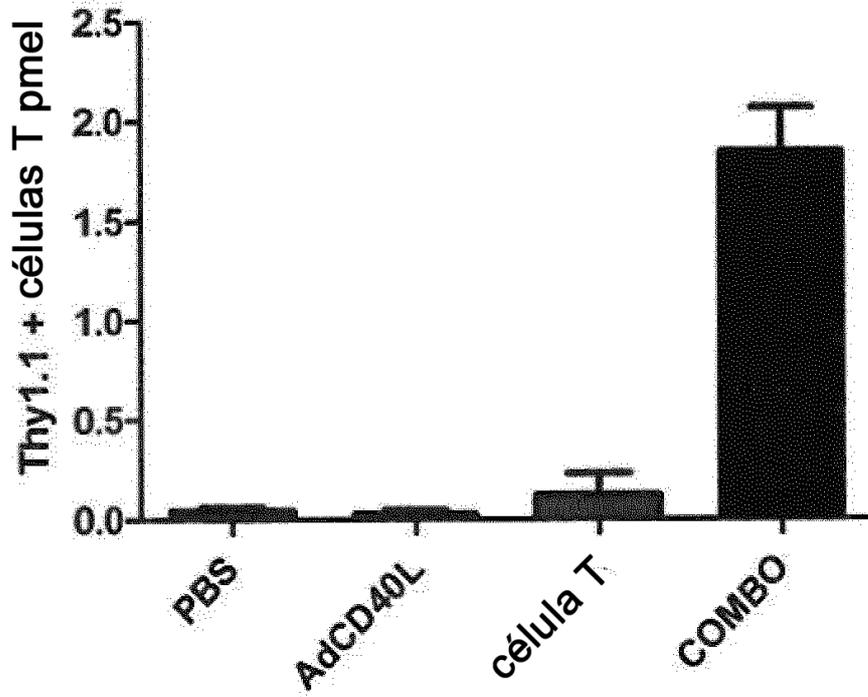


Figura 21

A



B

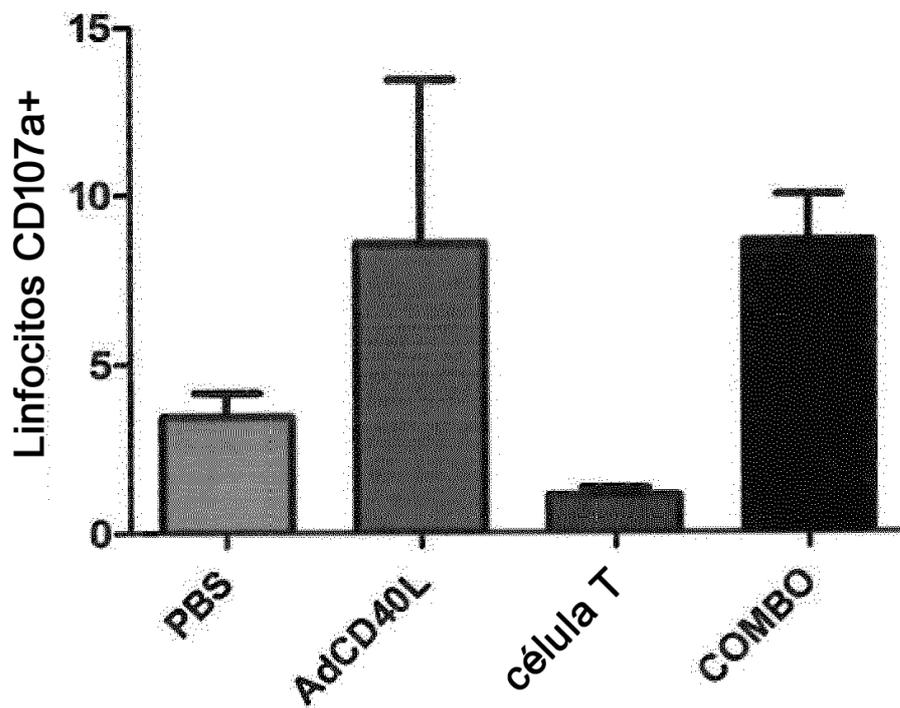
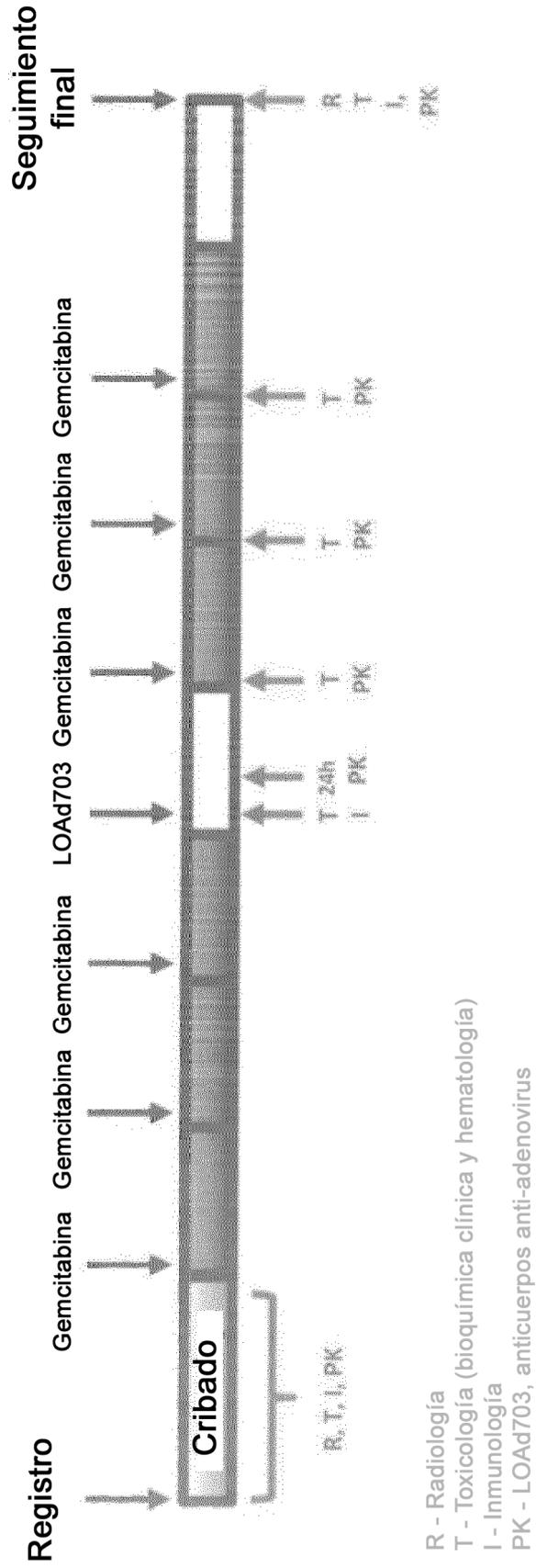


Figura 22



R - Radiología
T - Toxicología (bioquímica clínica y hematología)
I - Inmunología
PK - LOAd703, anticuerpos anti-adenovirus

