

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 785**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/US2013/024506**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116778**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13704334 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2809788**

54 Título: **Adenovirus que expresan antígenos oncogénos heterólogos**

30 Prioridad:

02.02.2012 US 201261594005 P

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**FUEYO-MARGARETO, JUAN;
GOMEZ-MANZANO, CANDELARIA;
YUNG, W.K., ALFRED;
KRASNYKH, VICTOR y
JIANG, HONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 759 785 T3

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

DESCRIPCIÓN

Adenovirus que expresan antígenos oncogénos heterólogos

5 **Antecedentes****I. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en líneas generales a los campos de oncología y tratamiento del cáncer. Más particularmente, se refiere a adenovirus inmunogénos.

II. Descripción de la técnica relacionada

15 El cáncer sigue siendo una de las causas principales de morbilidad y mortalidad en seres humanos en todo el mundo. Aunque se ha utilizado cirugía, quimioterapia y radiación con algo de éxito para curar el cáncer, se necesitan estrategias novedosas. Los virus que se replican en células tumorales mejor que en células normales se han mostrado prometedores como agentes oncolíticos. La viabilidad de la transferencia génica y la lisis tumoral usando adenovirus se ha consolidado (Kirn, 1999; Bischoff *et al.*, 1996; Wildner *et al.*, 1999a; Wildner *et al.*, 1999b; (Sterman *et al.*, Hum. Gene Ther. 9: 1083-1092 (1998)).

20 Sigue habiendo una necesidad de tratamientos antineoplásicos adicionales.

Sumario

25 Hay al menos cuatro mecanismos por los que los adenovirus competentes en la replicación pueden lograr tratamiento antineoplásico. En primer lugar, el adenovirus puede iniciar y completa una infección lítica, lisando de ese modo las células (oncólisis). En segundo lugar, el adenovirus puede expresar genes suicidas, tales como el gen de la timidina cinasa (HSVtk) o la proteína de fusión de citosina desaminasa-timidina cinasa (Rogulski *et al.*, Clin. Cancer Res. 3: 2081-2088 (1997)), que aumentará la actividad oncolítica. En tercer lugar, la administración de adenovirus puede combinarse con quimioterapia (incluyendo cualquier tratamiento con fármacos), o radiación para potenciar la actividad oncolítica de cada agente (Nielsen *et al.*, Cancer Gene Ther. 4: 835- 846 (1997)). Finalmente, el virus podría funcionar como inmunoestimulante, o como vector que expresa moléculas inmunoestimuladoras, provocando la estimulación de células efectoras inmunitarias específicas contra antígenos tumorales. Una estrategia de combinación usando oncólisis e inmunoestimulación es particularmente interesante porque puede ofrecer una respuesta duradera, a largo plazo a través de un "efecto de vacuna". Por tanto, hasta la presente invención, ha habido una necesidad en la técnica de un adenovirus selectivo para la replicación que tenga selectividad mejorada por células tumorales que expresan o presentan antígenos oncogénos.

40 La presente invención es como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un adenovirus oncolítico recombinante que tiene un genoma que comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican un antígeno oncogénico, por el que el adenovirus expresa el uno o más antígenos oncogénos en su superficie. Se divulgan composiciones de adenovirus que tienen antígenos cancerosos incorporados en proteínas de la cubierta de adenovirus, antígenos cancerosos expresados por el adenovirus o antígenos cancerosos suministrados con un adenovirus. En determinados aspectos, las proteínas de la cubierta modificadas comprenderán proteínas de fibra modificadas, proteínas hexón o proteínas pIX. Un adenovirus de antígeno modificado presentará antígenos cancerosos desde el primer ciclo de replicación, elevando el nivel de antígenos cancerosos en el medio tumoral. El nivel elevado de antígenos en el medio tumoral estimulará una respuesta inmunitaria contra los antígenos cancerosos y contra células tumorales lisadas. En determinados aspectos, la estimulación de la respuesta inmunitaria en combinación con la lisis de las células tumorales proporciona una inmunidad antitumoral potenciada que aumenta la probabilidad de regresión tumoral.

55 Una proteína de cubierta de adenovirus quimérico puede comprender de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 a aproximadamente 30 aminoácidos heterólogos insertados en o en lugar de la secuencia de aminoácidos de la proteína de cubierta o, como alternativa, fusionados al extremo C de la proteína de cubierta adenovírica. La proteína de cubierta adenovírica puede ser una proteína de fibra, una proteína básica de pentón, un hexón, o una proteína pIX. Un antígeno puede insertarse en la región hipervariable 1 de hexón (aminoácidos 139-167 de adenovirus humano de tipo 5), bucle HI de proteína de fibra (aminoácidos 537-549 del bucle HI de fibra de adenovirus humano de tipo 5) y/o conjugarse o fusionarse a la proteína IX (aminoácido 140 de proteína IX de adenovirus humano de tipo 5). En determinados aspectos, los aminoácidos heterólogos se ligan a la proteína de cubierta de adenovirus quimérico mediante una secuencia espaciadora de aproximadamente 3 aminoácidos a aproximadamente 30 aminoácidos, incluyendo todos los valores e intervalos entremedias.

65 Por tanto, aspectos de la presente divulgación incluyen un adenovirus que tiene múltiples antígenos oncogénos (TAA) acoplado a o administrado con un adenovirus oncolítico competente en la replicación. En determinados aspectos, los antígenos se presentan como proteínas de fusión con proteínas de cubierta adenovíricas. En otros

aspectos, los antígenos se unen covalente o no covalentemente a la cubierta de un adenovirus. Los antígenos unidos covalentemente pueden adherirse químicamente a la cubierta del adenovirus mediante conectores químicos. Los antígenos adheridos no covalentemente pueden unirse a la cubierta mediante afinidad entre el antígeno o un resto de unión adherido al antígeno y las proteínas de cubierta del adenovirus o los restos de unión adheridos a las proteínas de cubierta. En otros aspectos, el adenovirus puede formularse con una pluralidad de antígenos que se coadministran con una composición de adenovirus.

Determinadas realizaciones se refieren a un adenovirus oncolítico recombinante para su uso en métodos de tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesita. Se divulgan métodos que comprenden administrar a un tumor un adenovirus competente en la replicación y uno o más antígenos oncogénos. En determinados aspectos, el adenovirus competente en la replicación es un adenovirus delta-24. En otros aspectos, las proteínas de cubierta del adenovirus delta-24 se acoplan a uno o más antígenos oncogénos. En determinados aspectos, los antígenos oncogénos se presentan como proteínas de fusión o quimeras proteínicas sobre la superficie del adenovirus. Como se usa en este documento, "quimera" o "quimérica" se refiere a una sola unidad de transcripción que posee múltiples componentes, a menudo, pero no necesariamente, de diferentes proteínas. Como se usa en este documento, "quimérica" se usa para hacer referencia a la secuencia codificante que codifica proteínas adenovíricas que se han manipulado genéticamente para producir una proteína que comprende todo o parte de una proteína de cubierta adenovírica que tiene un segmento heterólogo que comprende un antígeno oncogénico. En otro aspecto, los antígenos se adhieren covalentemente mediante conectores químicos a la cubierta de un adenovirus. En otros aspectos más, los antígenos se formulan con un adenovirus competente en la replicación y se coadministran con el virus. En otros aspectos, los antígenos pueden administrarse antes o después del tratamiento con el adenovirus. En determinados aspectos, los antígenos se administran con un inmunoestimulador o potenciador.

En determinados aspectos de la presente divulgación, se proporciona un adenovirus que expresa una pluralidad de antígenos tumorales en su superficie. En determinados aspectos, se expresan 2, 3, 4 o 5 antígenos en la superficie del adenovirus, por ejemplo, insertando un ácido nucleico que codifique cada antígeno en un gen diferente que codifique una proteína de superficie del adenovirus. Los antígenos tumorales pueden expresarse como parte de la cápside o fibra, o producirse como proteínas exógenas ligadas a proteínas relacionadas con autofagia, tales como LC3 para aumentar la presentación de la proteína exógena durante la infección adenovírica y la replicación. La dirección a múltiples antígenos ayudará a generar una respuesta inmunitaria constante y eficaz.

Los antígenos oncogénos (TAA) incluyen, aunque sin limitación, alfafetoproteína (AFP), antígeno de melanoma - MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, antígeno carcinoembrionario (CEA) (IIGYVIGTQQATPGPAYSGREII, SEQ ID NO: 1), tirosinasa (Tyr), midkin (MK), BAGE, CASP-8, β -catenina, CA-125, CDK-1, ESO-1, gp75, gp100, MART-1, mucinas (MUC-1), MUM-1, p53, PAP, PSA, PSMA, ras, trp-1, HER-2, TRP-2, IL13R alfa, AIM-3 o NY-ESO1. En determinados aspectos, los TAA son C9orf112, SART1, BRAP, RTN4, GLEA2, TNKS2, KIAA0376, ING4, HSPH1, C13orf24, RBPSUH, C6orf153, NKTR, NSEP1, U2AF1L, CYNL2, TPR, SOX2 o GOLGA. El adenovirus puede expresar el antígeno oncogénico de longitud completa o un péptido inmunógeno del mismo.

Otros antígenos oncogénos incluyen, sin limitación, antígenos oncogénos que se han identificado como existentes en pacientes con cánceres cerebrales tales como gliomas, cuyos ejemplos representativos incluyen: AIM2 (ausente en melanoma 2), BMI1 (oncogén de dedo ring de polycomb BMI1), COX-2 (ciclooxigenasa-2), TRP-1 (proteína 1 relacionada con tirosina), TRP-2 (proteína 2 relacionada con tirosina), GP100 (glucoproteína 100), EGFRVIII (variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico), EZH2 (potenciador del homólogo 2 de zeste), LICAM (molécula de adhesión celular L1 humana), livina, livina β , MRP-3 (proteína 3 de resistencia a múltiples fármacos), nestina, OLIG2 (factor de transcripción de oligodendrocitos), SOX2 (secuencia 2 de HMG relacionada con SRY), ART1 (antígeno reconocido por linfocitos T 1), ART4 (antígeno reconocido por linfocitos T 4), SART1 (antígeno de carcinoma escamocelular reconocido por linfocitos T 1), SART2, SART3, B-ciclina, b-catenina, Gli1 (homólogo 1 de oncogén de glioma), Cav-1 (caveolina-1), catepsina B, CD74 (grupo de diferenciación 74), E-cadherina (adhesión dependiente de calcio epitelial), EphA2/Eck (receptor A2 de EPH/cinasa epitelial), Fra-1/Fosl 1 (antígeno 1 relacionado con fos), GAGE-1 (antígeno 1 G), gangliósido/GD2, GnT-V, β 1,6-N (acetilglucosaminiltransferasa-V), Her2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), Ki67 (antígeno asociado a proliferación nuclear del anticuerpo Ki67), Ku70/80 (subunidades de proteínas heterodiméricas Ku humanas), IL-13Ra2 (subunidad alfa-2 del receptor de interleucina-13), MAGE-A (antígeno 1 de melanoma), MAGE-A3 (antígeno 3 de melanoma), NY-ESO-1 (carcinoma escamocelular esofágico de Nueva York 1), MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T), PROX1 (proteína 1 de homeosecuencia prospero), PSCA (antígeno de células madre de próstata), SOX10 (secuencia 10 de HMG relacionada con SRY), SOX11, survivina, UPAR (receptor activador de plasminógeno de tipo urocinasa) y WT-1 (proteína 1 de tumor de Wilms). El adenovirus puede expresar el antígeno oncogénico de longitud completa o un péptido inmunógeno del mismo.

En determinados aspectos, el adenovirus puede expresar un antígeno oncogénico a partir de un ácido nucleico heterólogo incorporado en el genoma adenovírico. El ácido nucleico heterólogo puede estar bajo el control de un promotor adenovírico o heterólogo. Una región "heteróloga" de la construcción es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de una molécula de ácido nucleico más grande que no se encuentra en asociación con la molécula más grande de forma natural.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una glucoproteína de 170 kDa codificada por el protooncogén *c-erb B* (Ullrich *et al.*, Nature 309:418-425 (1984)). Este oncogén se activa en diversos cánceres, y está amplificado en aproximadamente un 40 % de los gliomas malignos. Un mutante del receptor de EGF (conocido como el mutante de tipo III o EGFRvIII), que comprende una delección en el marco de 267 aminoácidos en el dominio extracelular que crea una unión novedosa, se encuentra habitualmente en cánceres humanos, pero no se expresa en ningún tejido normal. La unión novedosa creada por la delección en EGFRvIII es inmunógena. La secuencia de EGFRvIII ase describe en la patente de Estados Unidos n.º 6 455 498. El EGFRvIII inmunógeno incluye los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0155282, particularmente los del párrafo [0362] y las tablas 4.1-4.3.

En una realización preferida, se proporciona un adenovirus oncolítico recombinante que comprende una proteína de superficie que contiene un epítipo de EGFRvIII inmunógeno. En un aspecto, el ácido nucleico que codifica EGFRvIII de longitud completa o un péptido inmunógeno del mismo se inserta en un gen que codifica una proteína de superficie adenovírica (por ejemplo, el gen *gene* nativo puede modificarse por mutagénesis por PCR para que incluya el epítipo), por lo que el adenovirus expresa una proteína de superficie quimérica que comprende el epítipo de EGFRvIII. Por tanto, la invención proporciona un adenovirus oncolítico recombinante que tiene un genoma que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica EGFRvIII o un péptido inmunógeno del mismo y dicho adenovirus oncolítico recombinante para su uso en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, el EGFRvIII o un péptido inmunógeno del mismo se inserta en el gen que codifica la proteína de fibra, preferiblemente en el bucle H1. Se ha demostrado que esta región del adenovirus es útil para la expresión del antígeno (Krause A. *et al.*, J. Virol., 80:5523-30 (2006)). El ácido nucleico que codifica EGFRvIII o un péptido inmunógeno del mismo puede insertarse en genes que codifican una o más proteínas de superficie de cualquier adenovirus. En un aspecto, el adenovirus es Delta-24. La expresión "péptido de EGFRvIII inmunógeno", como se usa en este documento, significa un péptido de longitud adecuada, por ejemplo, al menos 10 o 12 aminoácidos y hasta 15, 20, 25 o 30 aminoácidos o más que abarca la unión de ajuste mutada de la proteína EGFRvIII correspondiente, preferiblemente EGFRvIII humano. En una realización preferida, el ácido nucleico insertado en una proteína de superficie adenovírica codifica un péptido de 8-20 aminoácidos que consiste en, que consiste esencialmente en o que comprende la secuencia EKKKGYVV (SEQ ID NO: 2). Por ejemplo, el péptido puede tener una secuencia seleccionada del grupo que consiste en LEEKKGNY (SEQ ID NO: 3), LEEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 4), LEEKKGNYVTDH (SEQ ID NO: 5) o LEEKKGNYVTDHC (SEQ ID NO: 6). En una realización particularmente preferida, el péptido inmunógeno de EGFRvIII es LEEKKGNYVVT (SEQ ID NO: 4) y se inserta en el gen que codifica la proteína de fibra, preferiblemente en el bucle H1. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica el dominio extracelular de EGFRvIII completo se inserta en un gen que codifica una proteína de superficie del adenovirus.

En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona un adenovirus oncolítico recombinante que tiene un genoma que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo y dicho adenovirus oncolítico recombinante para su uso en el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo se inserta en un gen que codifica una proteína de superficie, por lo que el adenovirus expresa una proteína de superficie quimérica que comprende MAGE o un péptido inmunógeno del mismo. En un aspecto, el ácido nucleico que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo se inserta en una región E3 eliminada del adenovirus. El ácido nucleico que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo puede insertarse en genes que codifican una o más proteínas de superficie de cualquier adenovirus. En un aspecto, el adenovirus es Delta-24. En otros aspectos, el cáncer es un tumor primario o metastásico.

En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona un adenovirus oncolítico recombinante que tiene un genoma que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica NY-ESO-1 (GenBank U87459.1) o un péptido inmunógeno del mismo (por ejemplo, SLLMWITQCFLPVF (SEQ ID NO: 7)) y dicho adenovirus oncolítico recombinante para su uso en el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo se inserta en un gen que codifica una proteína de superficie, por lo que el adenovirus expresa una proteína de superficie quimérica que comprende NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo. En un aspecto, el ácido nucleico que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo se inserta en la región hipervariable 5 del gen que codifica el hexón del adenovirus. Se ha demostrado que esta región de adenovirus es útil para la expresión del antígeno (Crawford-Miksza y Schnurr, J. Virol., 70:1836-44 (1996)). El ácido nucleico que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo puede insertarse en genes que codifican una o más proteínas de superficie de cualquier adenovirus. En un aspecto, el adenovirus es Delta-24. En otros aspectos, el cáncer es tumor cerebral primario o metastásico.

En una realización particularmente preferida, la invención proporciona un adenovirus oncolítico recombinante que tiene un genoma que comprende: (a) ácido nucleico que codifica un péptido de EGFRvIII inmunógeno (por ejemplo, LEEKKGNYVVT) insertado en el gen que codifica el bucle H1 de la proteína de fibra adenovírica, (b) ácido nucleico que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo insertado en la región E3 eliminada del adenovirus y (c) ácido nucleico que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo insertado en la región hipervariable 5 del gen que codifica la proteína hexón adenovírica, y dicho adenovirus oncolítico recombinante para su uso en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, el adenovirus es Delta-24. En otros aspectos, el cáncer es un tumor cerebral primario o metastásico.

La inserción de ácidos nucleicos que codifican antígenos tumorales en genes adenovíricos debe hacerse "en el marco", de modo que el virus exprese el antígeno tumoral en su superficie.

5 Determinados aspectos no requieren la resección completa del tumor, que es un factor limitante en el reclutamiento de pacientes en otras estrategias. Además, determinados aspectos de los presentes métodos y composiciones tienen el potencial de generar memoria en el sistema inmunitario y evitar o reducir la probabilidad de recidiva tumoral.

10 La expresión "vector adenovírico competente en la replicación" se refiere a cualquier vector adenovírico que tenga alteraciones en ninguna función génica necesaria para la replicación del virus en células o tejidos específicos. El vector debe poder replicarse y empaquetarse, pero podría replicarse solamente de manera condicionada en células o tejidos específicos.

15 La expresión "beneficio terapéutico" o "tratamiento" se refiere a cualquier cosa que promueva o potencie el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de su afección, que incluye tratamiento de enfermedades preneoplásicas, neoplásicas e hiperproliferativas. Una lista de ejemplos no exhaustivos de esto incluye prolongación de la vida del sujeto cualquier periodo de tiempo, disminución o retardo en el desarrollo neoplásico de la enfermedad, disminución en la hiperproliferación, reducción en el crecimiento del tumor, retardo de las metástasis, reducción en la tasa de crecimiento de las células cancerosas o células tumorales, y una disminución en el dolor al sujeto que puede atribuirse a la afección del sujeto.

25 El término "glioma" se refiere a un tumor originado en la neuroglia del cerebro o médula espinal. Los gliomas derivan de tipos de células gliales tales como astrocitos y oligodendrocitos, por tanto, los gliomas incluyen astrocitomas y oligodendrogliomas, así como gliomas anaplásicos, glioblastomas y ependimomas. Los astrocitomas y ependimomas pueden aparecer en todas las zonas del cerebro y la médula espinal tanto en niños como en adultos. Los oligodendrogliomas normalmente aparecen en los hemisferios cerebrales de los adultos. Los gliomas representan un 75 % de los tumores cerebrales pediátricos y un 45 % de los tumores cerebrales en adultos. Otros tumores cerebrales son meningiomas, ependimomas, tumores de la región pineal, tumores del plexo coroideo, tumores neuroepiteliales, tumores embrionarios, tumores neuroblásticos periféricos, tumores de los nervios craneales, tumores del sistema hematopoyético, tumores de células germinales y tumores de la región estelar.

35 Otras realizaciones de la invención se analizan a lo largo de esta solicitud. Cualquier realización analizada con respecto a un aspecto de la invención se aplica a otros aspectos de la invención también y viceversa. Se entiende que cada realización descrita en este documento como realizaciones de la invención es aplicable a todos los aspectos de la invención. Se contempla que cualquier realización analizada en este documento puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención y viceversa. Además, pueden usarse composiciones y kits de la invención para conseguir métodos de la invención.

40 El uso de la palabra "un/o" o "una", cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

45 A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación típica de error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

50 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o" salvo que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoya la definición que se refiere a alternativas solamente e "y/o".

55 Como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivas o indefinidas y no excluyen elementos o etapas del método adicionales, no indicados.

60 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque se indiquen realizaciones específicas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

Breve descripción de los dibujos

65 FIG. 1. La estructura de adenovirus permite la modificación de varias regiones de su genoma para insertar epítopos que se presentarán como antígenos o ADNc de longitud completa para expresar proteínas. El panel izquierdo superior representa un adenovirus (vacuna de Delta-24) que tiene un genoma que comprende ácido nucleico que codifica tres antígenos tumorales distintos (péptido de EGFRvIII inmunógeno, péptido NY-ESO-1

inmunógeno y proteína MAGE de longitud completa) insertados en tres proteínas distintas (bucle H1 de la proteína de fibra, región hipervariable 5 del hexón y región E3 eliminada, respectivamente). Estos antígenos se expresarán en la superficie del adenovirus recombinante sin ninguna disminución en la potencia oncolítica y sin interferencia entre la expresión de las proteínas víricas. Cuando se administra a un paciente con cáncer, el adenovirus inducirá necrosis tumoral. La expresión de estos antígenos en el microentorno inflamatorio tumoral debe reclutar macrófagos y otras células presentadoras de antígeno para activar una respuesta inmunitaria antitumoral "redirigida".

FIG. 2. Construcción de un adenovirus novedoso que expresa un antígeno tumoral inmunógeno. Panel A. Un péptido de EGFRvIII inmunógeno (LEEKKGNYVVT) se ha clonado en el bucle H1 de la proteína de fibra de la vacuna de Delta-24. Panel B. La estrategia técnica usada para clonar el péptido en el bucle H1 se ha descrito (Suzuki *et al.*, Clin. Cancer Res. 7:120-6 (2001). El plásmido que contiene el gen de la proteína de fibra se modificó usando mutagénesis por PCR para que incluyera (es decir, para insertar) el péptido y después se sometió a recombinación homóloga en bacterias con el plásmido que contenía el resto de la secuencia del adenovirus que incluye la mutación de Delta-24. El producto final entonces se amplificó usando células 293.

FIG. 3. Expresión del péptido de EGFRvIII inmunógeno. El panel A ilustra una transferencia de Western que demuestra que el epítipo de EGFRvIII se expresa en la superficie del adenovirus Delta-24 modificado. El adenovirus Delta-24 que expresa proteína de fibra que contiene el epítipo de EGFRvIII (D24-EGFRvIII), construido de acuerdo con la figura 2, se sometió a lisado celular, extracción de proteínas y análisis de transferencia de Western. Usando anticuerpos contra la proteína de fibra adenovírica o el péptido de EGFRvIII, se confirma expresión elevada del antígeno de EGFRvIII. Se usó actina como control de carga. El panel B ilustra análisis de inmunofluorescencia de células cancerosas infectadas con D24-EGFRvIII usando anticuerpo contra el virus (Hexón), anticuerpo contra el péptido de EGFRvIII (EGFRvIII) y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Las imágenes ilustran que células infectadas con D24-EGFRvIII expresan el péptido de EGFRvIII. La tinción de ADN (DAPI) confirma que solamente las células infectadas expresan el péptido de EGFRvIII. Las cápsides adenovíricas se ensamblan en el núcleo.

FIG. 4. Evaluación de la presentación del epítipo de EGFRvIII en la superficie de células infectadas con D24-EGFRvIII. Se infectaron células HeLa con el adenovirus indicado a una m.o.i. de 50 ufp/célula. Unas 48 horas después, las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal de ratón L8A4 anti-EGFRvIII. El porcentaje de células con epítipo de EGFRvIII en la superficie se evaluó con citometría de flujo. Se usó D24 (adenovirus Delta-24 que no expresa el epítipo de EGFRvIII) como control para la infección vírica. Se usó IgG de ratón como control negativo para el anticuerpo.

FIG. 5. Delta-24-RGD induce respuesta inmunitaria antitumoral. Se implantaron células GL261 de forma intracraneal en ratones C57BL/6. Delta-24-RGD se inyectó en el tumor en los días 7 y 9. A los 7 días después de la última infección vírica, se aislaron los esplenocitos de ratón y se cocultivaron con células GL261. Se midió el IFN- γ secretado por los linfocitos por ELISA.

FIG. 6. El tratamiento con Delta-24-RGD provocó al reclutamiento de linfocitos T CD8+ y CD4+ en el sitio del tumor. Las células GL261 se implantaron de forma intracraneal en ratones C57BL/6. Se inyectó Delta-24-RGD en el tumor en los días 7 y 10. A los 7 días después de la última inyección vírica, se aislaron los linfocitos del cerebro y se caracterizaron por citometría de flujo.

Descripción

Los métodos y composiciones divulgados en este documento incluyen la construcción y verificación de vacunas adenovíricas que provocan una respuesta inmunitaria contra antígenos oncógenos para potenciar el tratamiento antitumoral.

I. Vacunas adenovíricas

El adenovirus (Ad) es un virus de ADN grande (~36 kb) que infecta seres humanos, pero que presenta un rango de hospedador amplio. Físicamente, el adenovirus es un virus icosaédrico que contiene un genoma de ADN lineal bicatenario. Hay aproximadamente 50 serotipos de adenovirus humano, que se dividen en seis familias basándose en criterios moleculares, inmunológicos y funcionales. En la edad adulta, casi todos los seres humanos se han visto infectados con los serotipos de adenovirus más comunes, siendo el efecto principal son síntomas similares al catarro.

La infección adenovírica de células hospedadoras provoca que el ADN adenovírico se mantenga de forma episómica, lo que reduce la genotoxicidad potencial asociada con los vectores de integración. Además, los adenovirus son estructuralmente estables, y no se ha detectado reordenamiento del genoma después de amplificación extensa. El adenovirus puede infectar prácticamente a la mayoría de células epiteliales independientemente de su fase en el ciclo celular. Has ahora, parece que la infección adenovírica está ligada a únicamente enfermedad leve tal como enfermedad respiratoria aguda en seres humanos.

Los miembros de cualquiera de los 57 serotipos de adenovirus humano (HAdV-1 a 57) pueden incorporar, acoplarse a o administrarse con uno o más péptidos antigénicos oncógenos de acuerdo con la invención. Ad5 humano está bien caracterizado genética y bioquímicamente (GenBank M73260; AC_000008). Por tanto, en una realización preferida, el adenovirus es un serotipo Ad5 competente en la replicación o un serotipo híbrido que comprende un

componente de Ad5. El adenovirus puede ser una cepa de tipo silvestre o puede estar modificado genéticamente para potenciar la selectividad tumoral, por ejemplo, por atenuación de la capacidad del virus de replicarse dentro de células quiescentes normales sin afectar a la capacidad del virus de replicarse en células tumorales. Ejemplos no limitantes de adenovirus englobados por la presente invención incluyen Delta-24, Delta-24-RGD, ICOVIR-5, ICOVIR-7, ONYX-015, ColoAd1, H101 y AD5/3-D24-GMCSF. Onyx-015 es un híbrido del serotipo vírico Ad2 y Ad5 con eliminaciones en las regiones E1B-55K y E3B para potenciar la selectividad del cáncer. H101 es una versión modificada de Onyx-015. ICOVIR-5 e ICOVIR-7 comprenden una delección del sitio de unión a Rb de E1A y un remplazo del promotor de E1A por un promotor de E2F. ColoAd1 es un serotipo Add11p/Ad3 quimérico. AD5/3-D24-GMCSF (CGTG-102) es un adenovirus de serotipo 5/3 con la cápside modificada que codifica GM-CSF (la proteína knob de la cápside de Ad5 se reemplaza con un dominio knob del serotipo 3).

En una realización particularmente preferida, el adenovirus es Delta-24 o Delta-24-RGD. Delta-24 se describe en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20030138405 y 20060147420. El adenovirus Delta-24 deriva del adenovirus de tipo 5 (Ad-5) y contiene una delección de 24 pares de bases dentro de la parte CR2 del gen de E1A que abarca la zona responsable de la unión a la proteína Rb (nucleótidos 923-946) correspondiente a los aminoácidos 120-127 en la proteína E1A codificada (Fueyo J *et al.*, *Oncogene*, 19:2-12 (2000)). Delta-24-RGD comprende además una inserción de la secuencia RGD-4C (que se une fuertemente a integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$) en el bucle H1 de la proteína knob de fibra (Pasqualini R. *et al.*, *Nat Biotechnol*, 15:542-546 (1997)). La delección de E1A aumenta la selectividad del virus por células cancerosas; la secuencia RGD-4C aumenta la infectividad del virus en gliomas.

Se han mostrado efectos antitumorales significativos de Delta-24 en sistemas de cultivo celular y en modelos de xenoinjerto de glioma maligno. Delta-24-RGD ha mostrado efectos antitumorales sorprendentes en un ensayo clínico en fase 1 y actualmente es objeto de ensayos clínicos adicionales. Aspectos de la presente invención se refieren a la potenciación de esta eficacia antitumoral.

El ciclo infeccioso del adenovirus tiene lugar en 2 etapas: la fase temprana que precede al inicio de la replicación del genoma adenovírico, y que permite la producción de las proteínas reguladoras y proteínas implicadas en la replicación y transcripción del ADN vírico, y la fase tardía que da lugar a la síntesis de las proteínas estructurales. Los genes tempranos están distribuidos en 4 regiones que están dispersas en el genoma adenovírico, denominadas E1 a E4 (E se refiere a "early" - temprano). Las regiones tempranas comprenden al menos seis unidades de transcripción, que poseen cada una de ellas sus propios promotores. La expresión de los genes tempranos está autorregulada, expresándose algunos genes antes que otros. Tres regiones, E1, E2 y E4 son esenciales para la replicación del virus. Por tanto, si un adenovirus es defectuoso en una de estas funciones, esta proteína tendrá que aportarse *in trans*, o el virus no podrá replicarse.

La región temprana E1 está ubicada en el extremo 5' del genoma adenovírico y contiene 2 unidades de transcripción víricas, E1A y E1B. Esta región codifica proteínas que participan muy pronto en el ciclo vírico y son esenciales para la expresión de casi todos los demás genes del adenovirus. En particular, la unidad de transcripción E1A codifica una proteína que transactiva la transcripción de los otros genes víricos, induciendo la transcripción desde los promotores de las regiones E1B, E2A, E2B, E3, E4 y los genes tardíos. Normalmente, las secuencias exógenas se integran en el lugar de la totalidad o parte de la región E3.

El adenovirus entra en la célula hospedadora permisiva mediante un receptor de superficie celular y después se internaliza. El ADN vírico asociado con determinadas proteínas víricas necesarias para las primeras etapas del ciclo de replicación entra en el núcleo de las células infectadas, donde se inicia la transcripción. La replicación del ADN adenovírico tiene lugar en el núcleo de las células infectadas y no requiere replicación celular. Se ensamblan nuevas partículas víricas o viriones después de que se hayan liberado de las células infectadas, y pueden infectar otras células permisivas.

Aspectos de la invención incluyen el desarrollo, la producción y la evaluación de una vacuna que comprende uno o más antígenos oncogénicos (TAA). El sistema de vector adenovírico no solamente proporciona un vehículo de suministro viable, sino que también puede provocar una respuesta inmunitaria antitumoral. El adenovirus está consolidado para su uso en transferencia génica en varias aplicaciones terapéuticas, incluyendo inmunoterapia antineoplásica y revascularización cardiovascular.

El adenovirus es un sistema de suministro atractivo. Realizaciones de la invención pueden utilizar un proceso celular en suspensión con promedios de rendimiento de 1×10^{16} partículas víricas por lote. El proceso puede ser sin o esencialmente sin proteína, suero y componentes de origen animal que lo hacen adecuado para una amplia gama de productos de vacuna tanto profiláctica como y terapéutica.

Varios factores favorecen el uso de adenovirus oncolíticos para el tratamiento de tumores cerebrales. En primer lugar, los gliomas normalmente están localizados y, por lo tanto, una estrategia local eficaz debe ser suficiente para curar la enfermedad. En segundo lugar, los gliomas albergan varias poblaciones de células que expresan diferentes anomalías genéticas. Por tanto, el espectro de tumores sensibles a la transferencia de un solo gen a células cancerosas puede estar limitado. En tercer lugar, los adenovirus competentes en la replicación pueden infectar y

destruir células cancerosas que están detenidas en G0. Como los gliomas incluyen invariablemente células que no están en ciclo, esta propiedad es importante. Finalmente, la ruta de p16-Rb es anómala en la mayoría de los gliomas, haciendo, por tanto, que la estrategia de Delta-24 sea apropiada para la mayoría de estos tumores. Aunque la pérdida de la función génica supresora tumoral de retinoblastoma se ha asociado con las causas de diversos tipos de tumores y no se limita al tratamiento de gliomas.

Si un adenovirus se ha mutado de modo que no pueda replicarse o sea de replicación condicionada (competente en la replicación en determinadas condiciones), puede requerirse una célula auxiliar para la replicación vírica. Cuando se requiere, pueden obtenerse líneas celulares auxiliares de células humanas tales como células de riñón embrionario humano, células musculares, células hematopoyéticas u otras células mesenquimatosas embrionarias o epiteliales humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden obtenerse de células de otras especies de mamífero que son permisivas para los adenovirus humanos. Dichas células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimatosas embrionarias o epiteliales de mono. En determinados aspectos, una línea celular auxiliar es 293. Pueden encontrarse diversos métodos de cultivo de células hospedadoras y auxiliares en la técnica, por ejemplo, Racher *et al.*, 1995.

En determinados aspectos, el adenovirus es normalmente competente en la replicación en células con una ruta de Rb mutante. Después de la transfección, se aíslan las placas adenovíricas de las células superpuestas en agarosa y las partículas víricas se expanden para el análisis. Para protocolos detallados, se remite a los expertos en la materia a Graham y Prevec, 1991.

Tecnologías alternativas para la generación de vectores adenovíricos incluyen la utilización del sistema de cromosoma artificial bacteriano (BAC), recombinación bacteriana *in vivo* en una cepa bacteriana recA+ utilizando dos plásmidos que contienen secuencias adenovíricas complementarias, y el sistema de cromosoma artificial de levadura (YAC) (publicaciones PCT 95/27071 y 96/33280).

El adenovirus es fácil de cultivar y manipular y muestra amplio rango de hospedador *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus puede obtenerse en concentraciones elevadas (por ejemplo, mayores de 10⁹ unidades formadoras de placas (ufp) por ml) y es muy infeccioso. El ciclo vital del adenovirus no requiere integración en el genoma de la célula hospedadora.

Pueden hacerse modificaciones del adenovirus oncolítico descrito en este documento para mejorar la capacidad del adenovirus oncolítico para tratar el cáncer. Dichas modificaciones de un adenovirus oncolítico se han descrito por Jiang *et al.* (Curr Gene Ther. 2009 oct 9(5):422-427), véase también la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20060147420.

La ausencia o la presencia de bajos niveles de receptor de virus de Coxsackie y adenovirus (CAR) en varios tipos de tumores puede limitar la eficacia del adenovirus oncolítico. Pueden añadirse diversos motivos peptídicos a la proteína knob de fibra, por ejemplo, un motivo RGD (las secuencias RGD imitan los ligandos normales de las integrinas de superficie celular), motivo Tat, motivo de polilisina, motivo NGR, motivo CTT, motivo CNGRL, motivo CPRECES o un motivo de marca de estrept. (Rouslahti y Rajotte, 2000). Un motivo puede insertarse en el bucle HI de la proteína de fibra adenovírica. Modificar la cápside permite la infección de la célula diana independiente de CAR. Esto permite una mayor replicación, infección más eficaz y lisis aumentada de las células tumorales (Suzuki *et al.*, 2001). También pueden añadirse secuencias peptídicas que se unen a receptores de glioma humano específicos tales como EGFR o uPR. Los receptores específicos encontrados de forma exclusiva o preferente en la superficie de células cancerosas pueden usarse como diana para la unión e infección adenovírica, tal como EGFRVIII.

II. Casetes de expresión

En determinadas realizaciones de la presente invención, los métodos expuestos en este documento implican secuencias de ácido nucleico que codifican un TAA, en los que el ácido nucleico está comprendido en un "casete de expresión". Se entiende que la expresión "casete de expresión" incluye cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico que codifique un producto génico (por ejemplo, un determinante antigénico) en que parte o la totalidad de la secuencia codifica el ácido nucleico puede transcribirse.

Promotores y potenciadores - Para que el casete de expresión logre la expresión de un transcrito, el ácido nucleico que codifica el gen estará bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que el inicio y la tasa de transcripción están controlados. Las expresiones "colocado de forma funcional", "unido de forma funcional", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación y/u orientación funcional correcta con respecto a una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un "potenciador", que se refiere a una secuencia reguladora de acción en *cis* implicada en la activación transcripcional de una secuencia ácido nucleico.

Se contempla cualquier promotor conocido por los expertos en la materia que fuera activo en una célula en un sujeto como promotor que puede aplicarse en los métodos y composiciones de la presente invención. Un experto en la

materia estaría familiarizado con los numerosos tipos de promotores que pueden aplicarse en los presentes métodos y composiciones. En determinadas realizaciones, por ejemplo, el promotor es un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor reprimible. El promotor también puede ser un promotor selectivo de tejido. Un promotor selectivo de tejido se define en este documento por referencia a cualquier promotor que sea relativamente más activo en determinados tipos tisulares en comparación con otros tipos tisulares. Ejemplos de promotores incluyen el promotor de CMV.

El promotor será uno que sea activo en una célula y cuya expresión a partir del promotor provoque la presentación de un determinante antigénico al sistema inmunitario de un sujeto. Por ejemplo, cuando la célula es una célula epitelial, el promotor usado en la realización será uno que tiene actividad en ese tipo celular particular.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con un gen o secuencia, que puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes 5' ubicadas en dirección 5' del segmento codificante y/o exón. Dicho promotor puede denominarse "endógeno". Asimismo, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, ubicado en dirección 3' o en dirección 5' de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrá determinadas ventajas al colocar el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otra célula procariota, virus o célula eucariota, y promotores o potenciadores que no "son de origen natural", es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores, pueden producirse secuencias usando tecnología de clonación recombinante y/o amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo PCR™ (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 4 683 202 y 5 928 906).

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija de forma eficaz la expresión del segmento de ADN en el tipo celular, órgano y organismo elegido para la expresión. Los expertos en la materia de biología molecular en general comprenden el uso de combinaciones de promotores, potenciadores y tipos celulares para la expresión de proteínas, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (2001). El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

No se cree que promotor particular que se emplea para controlar la expresión del ácido nucleico de interés se crucial, siempre que pueda expresar el polinucleótido en la célula diana a niveles suficientes. Por tanto, cuando se aborda una célula humana, es preferible colocar la región codificante polinucleotídica adyacente a y bajo el control de un promotor que pueda expresarse en una célula humana. En general, dicho promotor podría incluir un promotor humano o vírico.

En diversas realizaciones, puede usarse el promotor del gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano, el promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus del sarcoma Rous. Se contempla también el uso de otros promotores víricos o celulares de mamífero o fágicos bacterianos, que son bien conocidos en la técnica para conseguir la expresión de polinucleótidos, con la condición de que los niveles de expresión sean suficientes para producir una respuesta inmunitaria.

Ejemplos adicionales de promotores/elementos que pueden emplearse, en el contexto de la presente invención incluyen los siguientes, lo que no pretende ser exhaustivo de todos los posibles elementos promotores y potenciadores sino, simplemente, a modo de ejemplo de los mismos.

Cadena pesada de inmunoglobulina (Banerji *et al.*, 1983; Gilles *et al.*, 1983; Grosschedl *et al.*, 1985; Atchinson *et al.*, 1986, 1987; Imler *et al.*, 1987; Weinberger *et al.*, 1984; Kiledjian *et al.*, 1988; Porton *et al.*, 1990); cadena ligera de inmunoglobulina (Queen *et al.*, 1983; Picard *et al.*, 1984); receptor de linfocitos T (Luria *et al.*, 1987; Winoto *et al.*, 1989; Redondo *et al.*, 1990); HLA DQ α y/o DQ β (Sullivan *et al.*, 1987); interferón β (Goodbourn *et al.*, 1986; Fujita *et al.*, 1987; Goodbourn *et al.*, 1988); interleucina-2 (Greene *et al.*, 1989); receptor de interleucina-2 (Greene *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1990); MHC clase II (Koch *et al.*, 1989); MHC clase II HLA-DR α (Sherman *et al.*, 1989); β -actina (Kawamoto *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1989); creatina cinasa muscular (MCK) (Jaynes *et al.*, 1988; Horlick *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989); prealbúmina (transtiretina) (Costa *et al.*, 1988); elastasa I (Omitz *et al.*, 1987); metalotioneína (MTII) (Karin *et al.*, 1987; Culotta *et al.*, 1989); colagenasa (Pinkert *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987); albúmina (Pinkert *et al.*, 1987; Tronche *et al.*, 1989, 1990); α -fetoproteína (Godbout *et al.*, 1988; Campere *et al.*, 1989); t-globina (Bodine *et al.*, 1987; Perez-Stable *et al.*, 1990); β -globina (Trudel *et al.*, 1987); c-fos (Cohen *et al.*, 1987); c-HA-ras (Triesman, 1986; Deschamps *et al.*, 1985); insulina (Edlund *et al.*, 1985); molécula de adhesión celular neural (NCAM) (Hirsh *et al.*, 1990); α 1-antitripsina (Latimer *et al.*, 1990); histona H2B (TH2B) (Hwang *et al.*, 1990); colágeno de ratón y/o de tipo I (Ripe *et al.*, 1989); proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78) (Chang *et al.*, 1989); hormona del crecimiento de rata (Larsen *et al.*, 1986); amiloide A sérico (SAA) humano (Edbrooke *et al.*, 1989); trombonina I (TN I) (Yutzey *et al.*, 1989); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Pech *et al.*, 1989); distrofia muscular de Duchenne (Klamut *et al.*, 1990); SV40 (Banerji *et al.*, 1981; Moreau *et al.*, 1981; Sleigh *et al.*, 1985; Firak *et al.*, 1986; Herr *et al.*, 1986; Imbra *et al.*, 1986; Kadesch *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1986; Ondek *et al.*,

1987; Kuhl *et al.*, 1987; Schaffner *et al.*, 1988); polioma (Swartzendruber *et al.*, 1975; Vasseur *et al.*, 1980; Katinka *et al.*, 1980, 1981; Tyndell *et al.*, 1981; Dandolo *et al.*, 1983; de Villiers *et al.*, 1984; Hen *et al.*, 1986; Satake *et al.*, 1988; Campbell y/o Villarreal, 1988); retrovirus (Kriegler *et al.*, 1982, 1983; Levinson *et al.*, 1982; Kriegler *et al.*, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze *et al.*, 1986; Miksicek *et al.*, 1986; Celander *et al.*, 1987; Thiesen *et al.*, 1988; Celander *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1988; Reisman *et al.*, 1989); virus del papiloma (Campo *et al.*, 1983; Lusky *et al.*, 1983; Wilkie, 1983; Spalholz *et al.*, 1985; Lusky *et al.*, 1986; Cripe *et al.*, 1987; Gloss *et al.*, 1987; Hirochika *et al.*, 1987; Stephens *et al.*, 1987); virus de la hepatitis B (Bulla *et al.*, 1986; Jameel *et al.*, 1986; Shaul *et al.*, 1987; Spandau *et al.*, 1988; Vannice *et al.*, 1988); virus de la inmunodeficiencia humana (Muesing *et al.*, 1987; Hauber *et al.*, 1988; Jakobovits *et al.*, 1988; Feng *et al.*, 1988; Takebe *et al.*, 1988; Rosen *et al.*, 1988; Berkhout *et al.*, 1989; Laspia *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1989; Braddock *et al.*, 1989); citomegalovirus (CMV) (Weber *et al.*, 1984; Boshart *et al.*, 1985; Foecking *et al.*, 1986); virus de la leucemia del gibbon (Holbrook *et al.*, 1987; Quinn *et al.*, 1989).

Los potenciadores se detectaron originalmente como elementos genéticos que aumentaban la transcripción desde un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ADN. La distinción básica entre potenciadores y promotores es funcional. Una región potenciadora como conjunto debe poder estimular la transcripción a una distancia; esto no tiene que ser cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirijan el inicio de la síntesis de ARN en un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores a menudo son solapantes y contiguos, pareciendo a menudo que tengan una organización modular muy similar. Además, también podría usarse cualquier combinación de promotor/potenciador (según la base de datos de promotores eucariotas EPDB) para dirigir la expresión de un gen. La selección adicional de un promotor que se regule en respuesta a señales fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible de una construcción. Por ejemplo, con el polinucleótido bajo el control del promotor de PAI-1 humano, la expresión es inducible por el factor de necrosis tumoral. Ejemplos de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que puede activarse en respuesta a un estímulo específico incluyen (elemento/inductor): MT II/éster de forbol (TFA) o metales pesados (Palmiter *et al.*, 1982; Haslinger *et al.*, 1985; Searle *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1985; Imagawa *et al.*, 1987; Karin *et al.*, 1987; Angel *et al.*, 1987b; McNeill *et al.*, 1989); MMTV (virus del tumor mamario de ratón)/glucocorticoesteroides (Huang *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1981; Majors *et al.*, 1983; Chandler *et al.*, 1983; Ponta *et al.*, 1985; Sakai *et al.*, 1988); interferón β /poli(r)X o poli(rc) (Tavernier *et al.*, 1983); E2/E1A de adenovirus 5 (Imperiale *et al.*, 1984); colagenasa/éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987a); estromelísina/éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); SV40/éster de forbol (TPA) (Angel *et al.*, 1987b); gen MX murino/interferón, virus de la enfermedad de Newcastle (Hug *et al.*, 1988); gen GRP78/A23187 (Resendez *et al.*, 1988); α -2-macroglobulina/IL-6 (Kunz *et al.*, 1989); vimentina/suero (Rittling *et al.*, 1989); MHC clase I gen H-2kb/interferón (Blonar *et al.*, 1989); HSP70/E1A, antígeno T grande de SV40 (Taylor *et al.*, 1989, 1990a, 1990b); proliferina/éster de forbol-TPA (Mordacq *et al.*, 1989); factor de necrosis tumoral/PMA (Hensel *et al.*, 1989); y gen de la hormona estimulante del tiroides α /hormona tiroidea (Chatterjee *et al.*, 1989).

Señales de inicio - También puede ser necesaria una señal de inicio específica para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede que tengan que proporcionarse señales exógenas de control de la traducción, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto en la materia podría determinar fácilmente esto y proporcionar las señales necesarias.

IRES - En determinadas realizaciones de la invención, se emplea el uso de elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES pueden evitar el modelo de barrido del ribosoma de la traducción dependiente de capucho metilado 5' y empezar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (poliomielitis y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden ligarse a marcos abiertos de lectura heterólogos. Pueden transcribirse múltiples marcos abiertos de lectura conjuntamente, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos (véase las patentes de Estados Unidos n.º 5 925 565 y 5 935 819).

Sitios de clonación múltiple - Los casetes de expresión pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios para enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con tecnología recombinante convencional para digerir el vector.

Señales de poliadenilación - En la expresión, normalmente se incluye una señal de poliadenilación para lograr la poliadenilación apropiada del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica satisfactoria de la invención, y/o puede emplearse cualquiera de dichas secuencias. Realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona bovina del crecimiento, que es conveniente y/o se sabe que funciona bien en diversas células diana. También se contempla como elemento del casete de expresión un sitio de terminación de la transcripción. Estos elementos pueden servir para potenciar los niveles de mensajero y/o para minimizar la ultralectura desde el casete a otras secuencias.

Otros componentes del casete de expresión - En determinadas realizaciones de la invención, las células infectadas por el vector adenovirico oncolítico recombinante puede identificarse *in vitro* incluyendo un gen indicador en el vector de expresión. En general, un indicador de selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un

indicador de selección positiva es uno en que la presencia del gen indicador permite su selección, mientras que un indicador de selección negativa es uno en que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a fármaco (genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol). Otros tipos de indicadores incluyen indicadores que se pueden cribar tales como GFP.

Realizaciones de la invención pueden usar tecnologías de plataforma adenovírica actuales diseñadas para crear vacunas preparando un ácido nucleico adenovírico oncolítico recombinante que comprende un segmento de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno oncógeno. Aspectos de la construcción de vacuna adenovírica oncolítica recombinante incluyen insertar material genético en un vector adenovírico y confirmar la construcción a través de caracterización y secuenciación del ácido nucleico, virus y producto vírico. La vacuna adenovírica oncolítica recombinante entonces se pasa por una serie de estudios de viabilidad diseñados para evaluar su adaptabilidad.

III. Antígenos cancerosos

La presente invención es útil en el desarrollo de inmunización genética antineoplásica y lisis de un tumor. El desarrollo de estrategias de vacunación antineoplásica se ha racionalizado mediante la reciente identificación de antígenos oncógenos (TAA) que pueden reconocerlos el sistema inmunitario como marcadores específicos de células cancerosas, identificando de ese modo estas células como dianas. Estos antígenos oncógenos incluyen proteínas codificadas por genes con mutaciones o reordenamientos únicos de las células tumorales, genes embrionarios reactivados, antígenos de diferenciación específicos de tejido y otras varias proteínas propias. Sin embargo, a pesar de la identificación de estas dianas, el desarrollo de estrategias eficaces de vacunación antineoplásica ha estado limitado en gran medida por la ausencia de medios para una vacunación satisfactoria contra estos autoantígenos débiles. La generación de una respuesta inmunitaria potente antiantígeno oncógeno, por tanto, se reconoce como una cuestión clave en el desarrollo estrategias eficaces de inmunización antineoplásica.

El método de la presente invención es eficaz en el tratamiento o prevención de enfermedades. Muchas enfermedades tienen antígenos específicos asociados a la patología. Dichos antígenos o epítomos inmunodominantes de estos antígenos se usan en el reconocimiento inmunitario y eliminación definitiva o control de la enfermedad en un paciente. Dichos antígenos se denominan en la técnica antígenos protectores.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para tratar cánceres. Ejemplos específicos de tipos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, glioma, melanoma, metástasis, adenocarcinoma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer pulmonar, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer pancreático y similares.

El término melanoma incluye, aunque sin limitación, melanomas, melanomas metastásicos, melanomas derivados de melanocitos o células de nevos relacionados con melanocitos, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma *in situ*, melanoma de propagación superficial, melanoma nodular, melanoma sobre lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanoma invasivo o lunar atípico familiar y síndrome de melanoma (FAM-M). Dichos melanomas en mamíferos pueden estar causados por anomalías cromosómicas, crecimiento degenerativo y trastornos del desarrollo, agentes mitógenos, radiación ultravioleta (UV), infecciones víricas, expresión tisular inapropiada de un gen, alteraciones en la expresión de un gen y presentación en una célula, o agentes carcinógenos. Los cánceres mencionados anteriormente pueden evaluarse o tratarse por métodos divulgados en este documento. En el caso de cáncer, se incorpora un gen que codifica un antígeno asociado con el cáncer en el genoma vírico recombinante o parte del mismo junto con un gen que codifica una o más moléculas inmunoestimuladoras. El antígeno asociado con el cáncer puede expresarse en la superficie de una célula cancerosa, puede secretarse o puede ser un antígeno interno. En una realización, el antígeno asociado con el cáncer es un antígeno oncógeno (TAA) o parte del mismo. Ejemplos de TAA que pueden usarse en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, TAA de melanoma que incluyen, aunque sin limitación, MART-1 (Kawakami *et al.* J. Exp. Med. 180:347-352, 1994), MAGE-1, MAGE-3, GP-100 (Kawakami *et al.* Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 91:6458-6462, 1994), CEA, TRP-1, TRP-2, P-15 y tirosinasa (Brichard *et al.* J. Exp. Med. 178:489, 1993) y similares.

En determinadas realizaciones, un adenovirus expresará una pluralidad de antígenos en su superficie. En determinados aspectos, pueden expresarse 2, 3, 4 o 5 antígenos en la superficie. Los antígenos pueden expresarse como parte de la cápside o fibra, o producirse como proteínas exógenas ligadas a proteínas relacionadas con autofagia tales como LC3 para aumentar la presentación de la proteína exógena durante la infección y replicación adenovírica. La dirección a múltiples antígenos ayudará a generar una respuesta inmunitaria constante y eficaz. Los antígenos oncógenos (TAA) incluyen, aunque sin limitación, péptidos de EGFRvIII, alfafetoproteína (AFP), antígeno de melanoma - MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, antígeno carcinoembrionario (CEA) (IIGYVIGTQQATPGPAYSGREII, SEQ ID NO: 1), tirosinasa (Tyr), midkin (MK), BAGE, CASP-8, β -catenina, CA-125, CDK-1, ESO-1, gp75, gp100, MART-1, mucinas (MUC-1), MUM-1, p53, PAP, PSA, PSMA, ras, trp-1, HER-2, TRP-2, IL13R alfa, AIM-3, NY-ESO1, C9orf1 12, SART1, BRAP, RTN4, GLEA2, TNKS2, KIAA0376, ING4, HSPH1, C13orf24, RBPSUH, C6orf153, NKTR,

NSEP1, U2AF1L, CYNL2, TPR, SOX2 o GOLGA. La presente invención de ninguna manera está limitada a genes que codifican los TAA enumerados anteriormente. Otros TAA son conocidos por los expertos en la materia y pueden prepararse fácilmente por métodos conocidos, tales como los divulgados en la patente de Estados Unidos n.º 4 514 506.

5

IV. Composiciones farmacéuticas

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquier composición de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona una composición de vacuna que comprende cualquier composición de la presente invención. La composición de vacuna puede comprender además al menos un adyuvante.

10

La presente invención también proporciona una composición de la presente invención para su uso en un método de estimulación de una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición de la presente invención.

15

De acuerdo con la presente invención, un adenovirus oncolítico recombinante en combinación con un determinante antigénico se administra a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria con fines terapéuticos o profilácticos. Por tanto, en determinadas realizaciones, la construcción de expresión se formula en una composición que es adecuada para este fin. Las expresiones "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren a composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones perjudiciales cuando se administran a un animal o un ser humano. Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, vehículos, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las construcciones de expresión de la presente invención, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos complementarios en las composiciones. Por ejemplo, el ingrediente activo complementario puede ser un agente inmunógeno adicional.

20

25

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser líquida al grado en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Si es necesario, pueden usarse diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. Puede conseguirse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30

35

40

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando compuestos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad de los mismos.

45

50

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en dicha cantidad que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Para administración parenteral en una solución acuosa, la solución debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y en primer lugar el diluyente líquido debe hacerse isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravascular y intratumoral. A este respecto, los medios acuosos estériles, que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación.

55

Será necesaria alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza, como requiere la FDA.

60

Dosificación - Una cantidad eficaz del agente terapéutico o preventivo se determina basándose en el objetivo pretendido, por ejemplo, estimulación de una respuesta inmunitaria contra un tumor. Los expertos en la materia son muy conscientes de la manera en la que aplicar el suministro génico en situaciones *in vivo* y *ex vivo*. Para vectores víricos, en general se preparará una solución madre de vectores víricos. Dependiendo del tipo de virus y de

65

la concentración que se puede obtener, se suministrará al menos aproximadamente, como mucho aproximadamente o aproximadamente 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} o 1×10^{12} partículas infecciosas, o cualquier valor o intervalo entremedias, a un sujeto. En otros aspectos, los adenovirus de acuerdo con la invención pueden administrarse en una sola administración o múltiples administraciones. El virus puede administrarse a una dosificación de 1×10^5 unidades formadoras de placas (UFP), 5×10^5 UFP, al menos 1×10^6 UFP, 5×10^6 o aproximadamente 5×10^6 UFP, 1×10^7 , al menos 1×10^7 UFP, 1×10^8 o aproximadamente 1×10^8 UFP, al menos 1×10^8 UFP, aproximadamente o al menos 5×10^8 UFP, 1×10^9 o al menos 1×10^9 UFP, 5×10^9 o al menos 5×10^9 UFP, 1×10^{10} UFP o al menos 1×10^{10} UFP, 5×10^{10} o al menos 5×10^{10} UFP, 1×10^{11} o al menos 1×10^{11} , 1×10^{12} o al menos 1×10^{12} , 1×10^{13} o al menos 1×10^{13} . Por ejemplo, el virus puede administrarse a una dosificación entre aproximadamente 10^7 - 10^{13} , entre aproximadamente 10^8 - 10^{13} , entre aproximadamente 10^9 - 10^{12} o entre aproximadamente 10^8 - 10^{12} .

Los adenovirus de acuerdo con la invención pueden administrarse de forma local o sistémica. Por ejemplo, sin limitación, los virus oncolíticos de acuerdo con la invención pueden administrarse por vía intravascular (intrarterial o intravenosa), intratumoral, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, oral, parenteral, intranasal, intratraqueal, percutánea, intramedular, ocular o intracraneal.

Los adenovirus de acuerdo con la invención también pueden administrarse en un vehículo celular. A este respecto, las células madres neuronales y mesenquimatosas tiene alto potencial migratorio, pero permanecen confinadas al tejido tumoral. Una subpoblación de células mesenquimatosas adultas (células de infiltración tumoral derivadas de médula ósea o BM-TIC) ha demostrado infiltrarse, después de inyección en gliomas, en el tumor completo. Por tanto, los virus oncolíticos de acuerdo con la invención pueden administrarse en un vehículo de célula madre neuronal o mesenquimatoso productora de virus (por ejemplo, BM-TIC) (por ejemplo, por inyección de la célula de vehículo en el tumor).

La cantidad a administrar, de acuerdo tanto con el número de tratamientos como de la dosis, depende del sujeto a tratar, el estado del sujeto y la protección deseada. Las cantidades precisas de la composición terapéutica también dependen del criterio del facultativo y son peculiar para cada individuo.

También puede incorporarse un gen que codifica una o más moléculas coestimuladoras/accesorias y/o genes que codifican una citocina en el genoma adenovírico o formularse con un adenovirus para su uso en el método divulgado en este documento. Ejemplos de moléculas coestimuladoras incluyen, aunque sin limitación, B7-1, B7-2, ICAM1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, CD72 y similares. Ejemplos de citocinas englobadas por la presente invención incluyen, aunque sin limitación, IL-2, IL-1, IL-3 a IL-9, IL-11, IL-13 a IL-15, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, TNF α , IFN α , IFN γ , IL-10, IL-12, citocina regulada tras activación, expresada en T normales y supuestamente secretada (RANTES) y similares. Ejemplos de quimiocinas englobadas por la presente invención incluyen, aunque sin limitación, CTAP III, ENA-78, GRO, 1-309, PF-4, IP-10, LD-78, MBSA, MIP-1 α , MIP1B y similares.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un adenovirus oncolítico recombinante que tiene un genoma que comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican un antígeno oncógeno, por los que el adenovirus expresa el antígeno o antígenos oncógenos en su superficie.
- 10 2. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 1 que comprende entre 1 y 5 secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican cada una un antígeno oncógeno seleccionado del grupo que consiste en: MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, tirosinasa, midkin, BAGE, CASP-8, β -catenina, CA-125, CDK-1, ESO-1, gp75, gp100, MART-1, MUC-1, MUM-1, p53, PAP, PSA, PSMA, ras, trp-1, HER-2, TRP-1, TRP-2, IL13Ralfa, IL13Ralfa2, AIM-2, AIM-3, NY-ESO-1, C9orf112, SART1, SART2, SART3, BRAP, RTN4, GLEA2, TNKS2, KIAA0376, ING4, HSPH1, C13orf24, RBPSUH, C6orf153, NKTR, NSEP1, U2AF1L, CYNL2, TPR, SOX2, GOLGA, BMI1, COX-2, EGFRvIII, EZH2, LICAM, livina, livina β , MRP-3, nestina, OLIG2, ART1, ART4, B-ciclina, Gli1, Cav-1, catepsina B, CD74, E-cadherina, EphA2/Eck, Fra-1/Fosl 1, GAGE-1, gangliósido/GD2, GnT-V, β 1,6-N, Ki67, Ku70/80, PROX1, PSCA, SOX10, SOX11, survivina, UPAR y WT-1 o un péptido inmunógeno del mismo, por lo que el adenovirus expresa entre 1 y 5 antígenos tumorales en su superficie.
- 20 3. El adenovirus oncolítico recombinante de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica CEA o un péptido inmunógeno del mismo, por lo que el adenovirus expresa una proteína quimérica en su superficie, comprendiendo la proteína quimérica la totalidad o parte de una proteína de cubierta adenovírica que tiene un segmento heterólogo que comprende CEA o un péptido inmunógeno del mismo, tal como la SEQ ID NO: 1.
- 25 4. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 3, en el que el ácido nucleico heterólogo se inserta en la región hipervariable 5 del gen de hexón del adenovirus.
- 30 5. El adenovirus oncolítico recombinante de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica EGFRvIII o un péptido inmunógeno del mismo, por lo que el adenovirus expresa una proteína quimérica en su superficie, comprendiendo la proteína quimérica la totalidad o parte de una proteína de cubierta adenovírica que tiene un segmento heterólogo que comprende EGFRvIII o un péptido inmunógeno del mismo, tal como un péptido inmunógeno de EGFRvIII seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2-6.
- 35 6. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 5, en el que el ácido nucleico heterólogo se inserta en la región del bucle H1 del gen de fibra adenovírica.
- 40 7. El adenovirus oncolítico recombinante de cualquier reivindicación anterior que tiene un genoma que comprende 2-5 secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican cada una un antígeno oncógeno, por lo que el adenovirus expresa los antígenos oncógenos asociados en su superficie.
- 45 8. El adenovirus oncolítico recombinante de cualquier reivindicación anterior que comprende ácido nucleico heterólogo que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo.
- 50 9. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 8, en el que el adenovirus comprende una delección de parte o toda la región del gen E3.
- 55 10. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 9, en el que dicho ácido nucleico heterólogo se inserta en la región del gen E3 eliminado del adenovirus, por lo que el adenovirus expresa MAGE o un péptido inmunógeno del mismo en su superficie.
- 60 11. El adenovirus oncolítico recombinante de cualquier reivindicación anterior, que comprende ácido nucleico heterólogo que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo, por lo que el adenovirus expresa una proteína quimérica en su superficie, comprendiendo la proteína quimérica la totalidad o parte de una proteína de cubierta adenovírica que tiene un segmento heterólogo que comprende NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo, tal como la SEQ ID NO: 7.
- 65 12. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 11, en el que dicho ácido nucleico heterólogo se inserta en la región hipervariable 5 del gen de hexón del adenovirus.
13. El adenovirus oncolítico recombinante de la reivindicación 1 que tiene una delección en parte o toda la región del gen E3 y que tiene un genoma que comprende:
- a. ácido nucleico heterólogo que codifica CEA o un péptido inmunógeno del mismo insertado en la región hipervariable 5 del gen de hexón del adenovirus;
 - b. ácido nucleico heterólogo que codifica EGFRvIII o un péptido inmunógeno del mismo insertado en la región del bucle H1 del gen de fibra del adenovirus;
 - c. ácido nucleico heterólogo que codifica MAGE o un péptido inmunógeno del mismo insertado en la región del gen E3 eliminado del adenovirus; y

d. ácido nucleico heterólogo que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunógeno del mismo insertado en la región hipervariable 5 del gen de hexón del adenovirus.

- 5 14. El adenovirus oncolítico recombinante de cualquier reivindicación anterior, en el que el adenovirus se selecciona de ICOVIR-5, ICOVIR-7, ONYX-015, ColoAd1, H101 y AD5/3-D24-GMCSF; o en el que el adenovirus es un adenovirus humano de tipo 5 o un híbrido que comprende un componente de adenovirus humano de tipo 5, tal como Delta-24 o Delta-24-RGD.
- 10 15. Un adenovirus oncolítico recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en un método para tratar el cáncer en un paciente que lo necesita, en donde el paciente es opcionalmente un paciente humano.
- 15 16. El adenovirus oncolítico recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el paciente tiene un cáncer seleccionado de cáncer cerebral primario o metastásico, melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer pulmonar, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma no hodgkiniano, linfoma de Hodgkin, leucemia, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervicouterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y cáncer pancreático; tal como un glioma de nivel bajo o nivel alto.
- 20 17. El adenovirus oncolítico recombinante para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16, en el que el adenovirus es para administración intratumoral, intravascular o en un vehículo de célula madre neuronal o mesenquimatoso, y/o en el que el adenovirus es para administración una vez o múltiples veces a una dosis de 10^8 - 10^{13} unidades formadoras de placas (ufp).

Figura 1

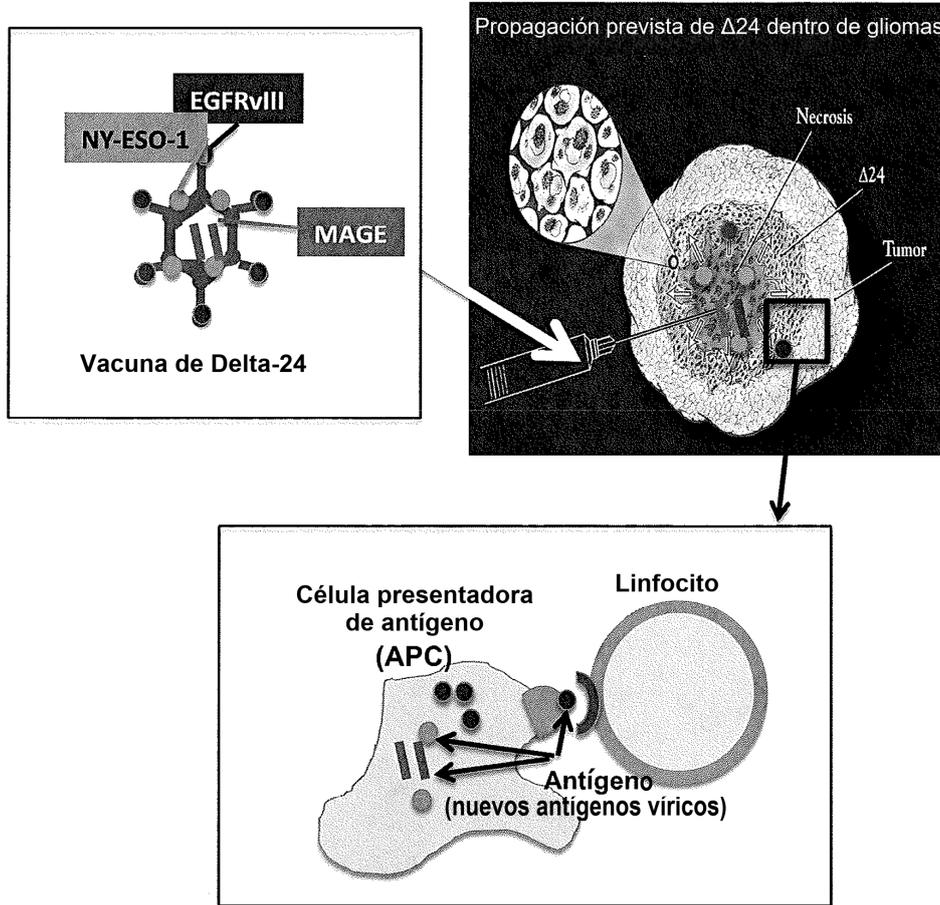


Figura 2

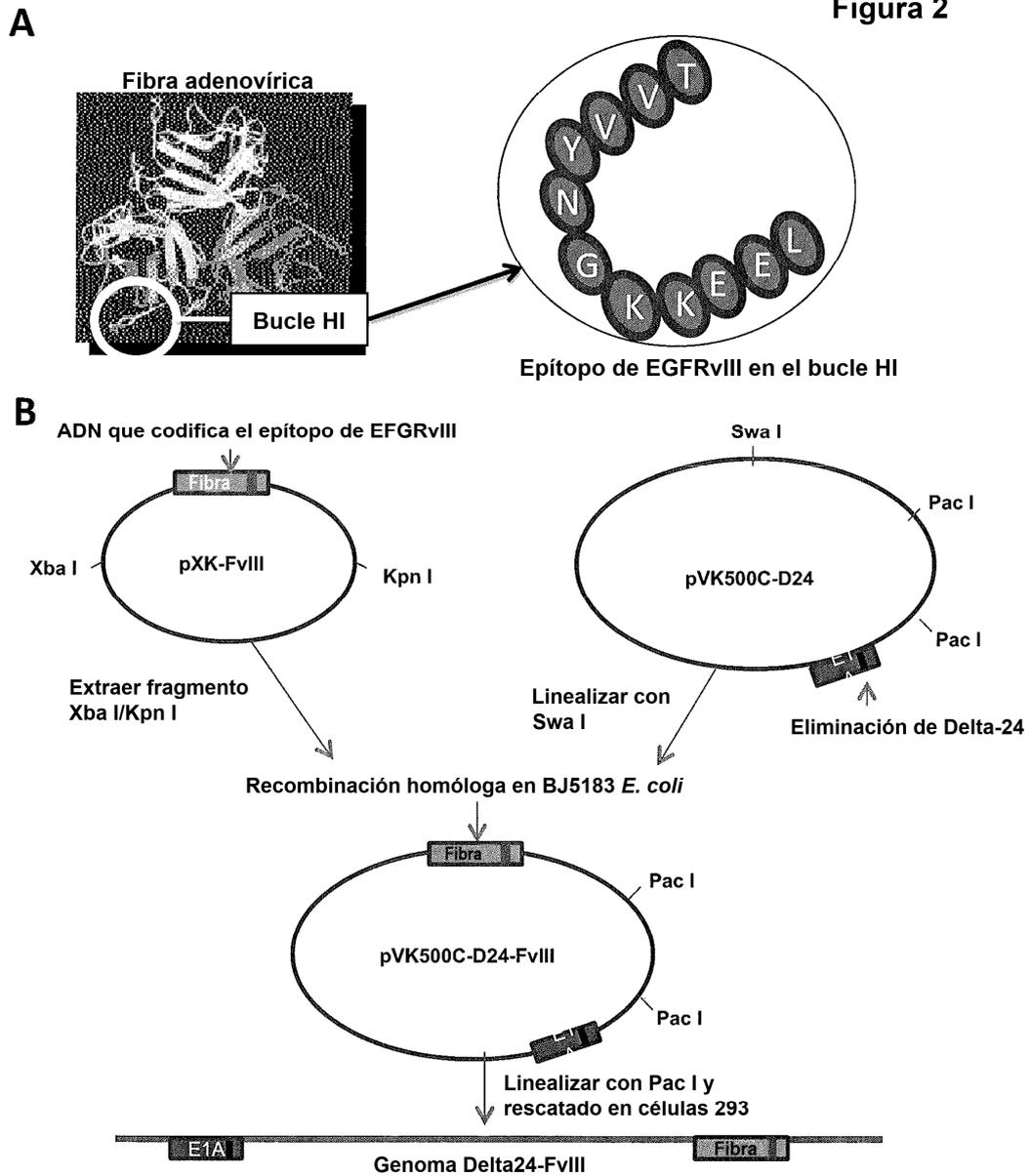


Figura 3

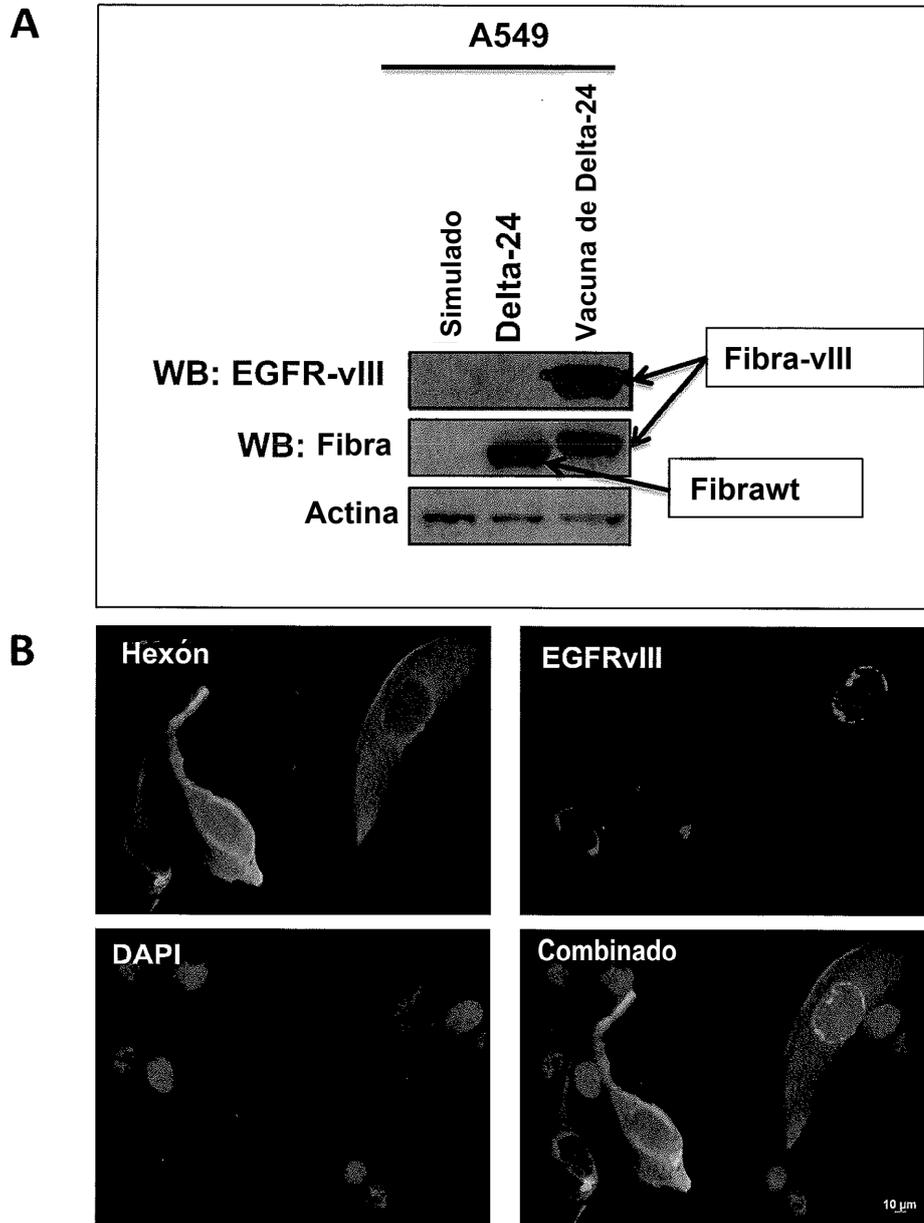


Figura 4

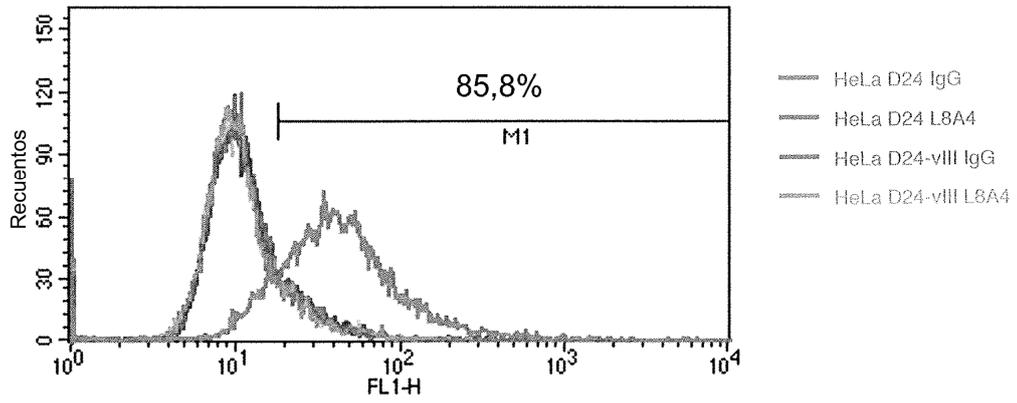


Figura 5

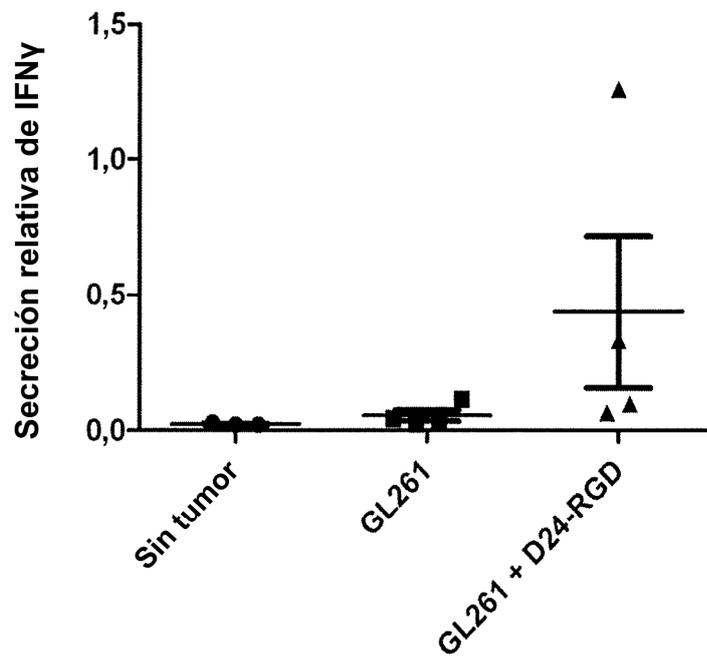


Figura 6

