

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 489**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 35/761 (2015.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014** **PCT/US2014/066920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15077624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014** **E 14864921 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019** **EP 3071697**

54 Título: **Adenovirus que expresa agonista(s) del receptor estimulante de células inmunitarias**

30 Prioridad:

22.11.2013 US 201361907860 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.06.2020

73 Titular/es:

DNATRIX, INC. (50.0%)
2450 Holcombe Boulevard, Suite X+200
Houston, TX 77021, US y
THE BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (50.0%)

72 Inventor/es:

TUFARO, FRANK;
FUEYO-MARGARETO, JUAN;
GOMEZ-MANZANO, CANDELARIA;
CONRAD, CHARLES;
YUNG, W.K., ALFRED y
JIANG, HONG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 765 489 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 expresa agonista(s) del receptor estimulante de células inmunitarias

Antecedentes

I. Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere en general a los campos de la oncología y la terapia contra el cáncer. Más particularmente, se trata de virus oncolíticos replicativos genéticamente modificados para expresar un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias, tal como el ligando OX40 (OX40L).

II. Descripción de la técnica relacionada

- 10 El cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los seres humanos de todo el mundo. Aunque la cirugía, la quimioterapia y la radiación se han utilizado con cierto éxito para curar el cáncer, se necesitan nuevas estrategias. Los virus que se replican en los linfocitos Tumorales mejor que en las células normales han demostrado ser prometedores como agentes oncolíticos. La viabilidad de la transferencia génica y la lisis tumoral con adenovirus está bien establecida. Una publicación de Andarini y col. (Andarini y col., 2004, "Adenovirus vector-mediated *in vivo* gene transfer of OX40 ligand to tumor cells enhances antitumor immunity of tumor-bearing hosts", Cancer research 64(9), 3281-3287) se refiere a un vector de adenovirus basado en el serotipo 5 de replicación deficiente con delecciones E1 y E3 en el que el ADN de OX40L de ratón está bajo control transcripcional del potenciador y promotor inmediato-temprano del citomegalovirus, y su uso contra el melanoma B16, carcinoma de pulmón de Lewis y adenocarcinoma de colon de colon-26 en ratones.

Sigue existiendo la necesidad de terapias adicionales contra el cáncer.

Sumario

- 20 La presente invención se refiere a nuevos virus oncolíticos competentes en la replicación que expresan uno o más agonistas de los receptores estimulantes de las células inmunitarias, composiciones farmacéuticas que comprenden el adenovirus oncolítico competente en la replicación y dichos virus oncolíticos y composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. En realizaciones preferidas, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus. El virus oncolítico competente en la replicación presentará el agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias del primer ciclo de replicación, desencadenando una respuesta inmunitaria antitumoral efectora persistente mediante la activación de linfocitos que reconocen los antígenos tumorales y revirtiendo el entorno inmunosupresor que rodea el tumor. En ciertos aspectos, la administración del virus oncolítico competente en la replicación, tal como el adenovirus, a un sujeto con cáncer proporciona una inmunidad antitumoral mejorada e incluso sinérgica en comparación con el virus no modificado (es decir, no expresa un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias) y el agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias cuando se administran por separado. En aspectos relacionados, los efectos antitumorales del virus oncolítico competente en la replicación persisten incluso después de la eliminación del virus e incluso se extienden a uno o más tumores no infectados.

- 35 En ciertos aspectos, el virus oncolítico competente en la replicación expresa un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias de un ácido nucleico heterólogo incorporado en una región no esencial del genoma viral, comprendiendo el ácido nucleico heterólogo una secuencia de ácido nucleico que codifica el agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias. En algunas realizaciones, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus y la expresión del agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias está bajo el control de un promotor de adenovirus endógeno como el promotor E3 o un promotor adenoviral tardío como el promotor tardío principal. En otras realizaciones, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus y el ácido nucleico que codifica el agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias está bajo el control de (es decir, unido operativamente a) una secuencia de control transcripcional y/o traduccional no adenoviral tal como un potenciador, secuencia promotora y/o líder de citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, un promotor de CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV) (por ejemplo, un promotor de RSV) o virus simio 40 (SV40) (por ejemplo, un promotor de SV40). 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 en la naturaleza.

- En varias realizaciones de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación expresa un agonista de un receptor estimulante de células inmunitarias seleccionado del grupo que consiste en: CD28, receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR), CD137 (4-1BB) y mediador de entrada del virus del herpes A (HVEM). En varias realizaciones de la invención, el virus oncolítico competente en la replicación expresa un agonista de un receptor estimulante de células inmunitarias, es decir, OX40. OX40, GITR, CD137 y HVEM son miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) que se expresan de manera inducible tras la activación de los linfocitos T y, en consecuencia, inducen la coestimulación en los linfocitos T efectores activados y los linfocitos T de memoria.
- 50 La estimulación a través de CD28 debe ser inducida por células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, tales como células dendríticas y macrófagos; la coestimulación a través de miembros de la familia del TNFR, tal como OX40 y CD137 puede inducirse mediante la expresión de sus respectivos ligandos en células no hematopoyéticas en la

periferia. En una realización preferida, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus.

CD28 es el receptor de coestimulación más destacado y se expresa constitutivamente en los linfocitos T y desempeña un papel fundamental en la estimulación de los linfocitos T intactos para la proliferación, la función efectora y la diferenciación. En una realización de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) expresa un agonista de un agonista de CD28, tal como CD80 humano (B7.1), n.º de acceso de GenBank NM_005191 (ARNm) y NP_005182 (proteína) o CD86 (B7.2), n.º de acceso de GenBank NM_175862 (ARNm) y n.º de acceso. P42081 en la base de datos Swiss-Prot.

GITR se expresa constitutivamente a niveles altos en linfocitos T reguladores y linfocitos T CD4+ y CD8+ activados. Se ha demostrado que la participación de GITR por su ligando del receptor GITR (GITRL) amortigua los efectos supresores de los linfocitos T reguladores y coactiva los linfocitos T efectores. En una realización de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) expresa un agonista de GITR, tal como GITRL humano, NCBI database Entrez Gene ID: 8995.

4-1BB (CD37) se expresa en la superficie de los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados, en células NK naturales, monocitos y células dendríticas en reposo. El acoplamiento de 4-1BB con su ligando, 4-1BB (4-1BBL), desempeña un papel en la supervivencia de los linfocitos T y el establecimiento de la memoria inmunológica a largo plazo y promueve selectivamente las citocinas de tipo 1, tal como IL-2, IFN- γ y TNF- α . En una realización de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) expresa un agonista de 4-1BB tal como 4-1BBL humano, cuya secuencia de aminoácidos completa se puede encontrar con el número de acceso P41273 en la base de datos Swiss-Prot.

HVEM se expresa en linfocitos T de sangre periférica, linfocitos B y monocitos. El acoplamiento de HVEM con su receptor LIGHT coestimula la activación de los linfocitos T y B, regula por aumento los genes apoptóticos e induce la producción de citocinas, en concreto, de IFN- γ y TNF α . En una realización de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) expresa un agonista de HVEM, tal como de tipo linfotóxina humana (LIGHT), cuya secuencia de aminoácidos completa se puede encontrar con el número de acceso 043557 en la base de datos Swiss-Prot.

En una realización preferida de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista de OX40, por ejemplo, OX40L (gp34). En una realización preferida de la invención, el virus oncolítico competente en la replicación comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista de OX40, es decir, OX40L (gp34). Un agonista de OX40 interacciona con el receptor de XO40 en, por ejemplo, los linfocitos T activados durante o poco después de la preparación por un tumor o antígeno adenoviral y da como resultado una respuesta inmunitaria mejorada y prolongada al tumor. Preferentemente, el agonista OX-40 se expresa en la superficie de la célula huésped (por ejemplo, la célula tumoral) después de la infección de la célula con el virus oncolítico competente en la replicación. En una realización preferida, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista de OX40.

En una realización particularmente preferida de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un fragmento de unión al receptor OX40 de OX40L o una proteína de fusión OX40L, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos n.º. 7.959.925. En una realización particularmente preferida de la invención, el virus oncolítico competente en la replicación comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica el ligando de OX40 (OX40L o gp34). En una realización particularmente preferida, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica OX40L. OX40L, también conocido como gp34, como otros miembros de la superfamilia del TNF, existe como un homotrímero en la superficie de los linfocitos B activados, los linfocitos T, las células dendríticas y las células endoteliales. La unión de OX40L a OX40 (CD134) mantiene la respuesta inicial de linfocitos T mediada por CD28 y promueve tanto la diferenciación como la supervivencia de los linfocitos T. En particular, se ha demostrado que la participación de OX40 por su ligando natural OX40L u otros agonistas de OX40 proporciona señales clave que pueden aumentar las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8. La señalización de OX40 también controla la diferenciación de linfocitos T reguladores y la función supresora. Es importante destacar que numerosos estudios han destacado la capacidad de los agonistas específicos de OX40 para mejorar la inmunidad antitumoral o mejorar la enfermedad autoinmune, respectivamente. Sobre la base de estos estudios, se ha llevado a cabo el desarrollo de reactivos específicos para OX40 y OX40L para uso clínico. Los estudios realizados durante la última década han demostrado que los agonistas de OX40 mejoran la inmunidad antitumoral en modelos preclínicos que usan tumores inmunogénicos; sin embargo, el tratamiento de tumores poco inmunogénicos ha tenido menos éxito. La combinación de estrategias que preparan linfocitos T específicos de tumor junto con la señalización de OX40 podría generar y mantener una respuesta inmunitaria antitumoral terapéutica. La secuencia de aminoácidos del OX40L humano se describe en el número de acceso de GenBank NP_003317.1. El ADNc completo que codifica OX40L humano está en la secuencia de referencia del NCBI: NM_003326.3. En el número de acceso de SwissProt P23510 se desvelan además secuencias adicionales de OX40L. El OX40L humano comparte una identidad de secuencia de aminoácidos del 46 % con su homólogo de ratón.

Otros agonistas de OX40 que pueden expresarse mediante el adenovirus oncolítico competente en la replicación de acuerdo con la divulgación incluyen anticuerpos contra OX40, tales como los descritos en las patentes de Estados

Unidos números 6,312,700, 7,504,101, 7,291,331 y 7,807,156. Los ejemplos no limitantes específicos del anticuerpo OX40 incluyen 112F32, 112V8, 112Y55, 112Y131, 112Z5, mAb 315, mAb131, mAb 2G2, IF7, ACT35, mAb L106 y mAb OX86. Otros agonistas de OX40 incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US20060281072.

- 5 Se puede insertar ADN que codifica un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias, por ejemplo, en cualquier ubicación no esencial en el virus oncolítico siempre que el virus oncolítico siga siendo competente en la replicación. En una realización, el virus oncolítico es un adenovirus con un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias insertado aguas abajo del gen de la fibra del adenovirus mediante el cual se dirige la expresión de la proteína codificada por el promotor tardío principal del adenovirus. En una realización preferida, un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias se inserta en la región E3 de un esqueleto de adenovirus competente en la replicación. La región E3 no es esencial para la replicación viral; sin embargo, las proteínas E3 desempeñan un papel en la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped. El adenovirus competente en la replicación puede comprender una delección de E3 total o parcial. Por ejemplo, el adenovirus competente en la replicación puede comprender delecciones de uno, dos, tres o más marcos de lectura abiertos (ORF) en la región E3 y el ácido nucleico heterólogo insertado en su lugar. En una realización, los genes gp19k y 6.7K se delecionan y el ácido nucleico heterólogo se inserta en una región E3 con delección de gp19k/6.7K. En una realización relacionada, la región entre los sitios de la enzima de restricción *Bgl*II en 78.3 y 85.8 unidades de mapa del genoma de adenovirus de tipo 5 se puede deleccionar y el ácido nucleico heterólogo se inserta en la región E3 deleccionada, como se describe en Bett y col., J. Virol., 67(10):5911-5922 (1993). En aspectos relacionados, la región E3 completa se delecciona del esqueleto de adenovirus competente en la replicación y el ácido nucleico heterólogo se inserta en una ubicación que contiene la delección de E3 completa. En una realización particularmente preferida, la presente invención proporciona un adenovirus Delta-24 o Delta-24-RGD que comprende un ácido nucleico heterólogo insertado en lugar de una región E3 parcial o completamente deleccionada, en el que el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia que codifica un agonista de OX40, es decir, OX40L, y la expresión del agonista de OX40 está bajo el control de un promotor no adenoviral, tal como un promotor de CMV.

- Ciertas realizaciones de la divulgación están dirigidas a procedimientos para tratar el cáncer, que comprenden administrar a un tumor un virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) que expresa uno o más agonistas del receptor estimulante de células inmunitarias como se ha descrito anteriormente o una composición farmacéutica que comprende el virus oncolítico competente en la replicación. En ciertos aspectos, los procedimientos comprenden administrar a un tumor un adenovirus Delta-24 que comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias insertado en una región no esencial del esqueleto del adenovirus Delta-24. En una realización preferida, parte de la región E3 o toda la región E3 del genoma del adenovirus Delta-24 se delecciona y se reemplaza con el ácido nucleico heterólogo. En una realización particularmente preferida, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar el cáncer (por ejemplo, glioma) en un sujeto humano mediante la administración al sujeto de un adenovirus Delta-24-RGD que comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el agonista del receptor estimulante de células inmunitarias (por ejemplo, OX40L) en una región no esencial del esqueleto de adenovirus (por ejemplo, una región E3 deleccionada). En algunas realizaciones, el sujeto humano exhibe un patrón de interleucina Th1. En otras realizaciones, el sujeto humano exhibe un patrón de interleucina Th2. Se determina que un sujeto exhibe un patrón de interleucina Th2 si el sujeto tiene una relación IL-12/IL-4 de menos de aproximadamente 20, menos de aproximadamente 15 nM o menos de aproximadamente 10. Los sujetos que exhiben un patrón de interleucina Th1 generalmente exhibirán una relación IL-12/IL-4 mayor que 20 y, en algunos casos, mayor que 50, mayor que 100 e incluso mayor que 300. La relación IL-12/IL-4 se puede determinar en el sujeto obteniendo una muestra del sujeto (por ejemplo, una muestra de sangre o suero), poner en contacto la muestra con anticuerpos contra IL-12 e IL-4 y determinar la cantidad de IL-12 e IL-4 en la muestra en función de la cantidad de unión de los anticuerpos a sus respectivos antígenos (por ejemplo, mediante ELISA).

- En realizaciones relacionadas de la divulgación, uno o más agentes estimulantes de Th1 se administran conjuntamente con el virus oncolítico competente en la replicación que expresa uno o más agonistas de los receptores estimulantes de células inmunitarias como se ha descrito anteriormente para tratar el cáncer (por ejemplo, glioblastoma) en un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una relación IL-12/IL-4 de menos de aproximadamente 20 (es decir, exhibe un patrón de interleucina Th2). En otras realizaciones, el sujeto tiene una relación IL-12/IL-4 mayor de aproximadamente 20 (es decir, exhibe un patrón de interleucina Th1). Los agentes estimulantes de Th1 incluyen, sin limitación, (i) citocinas Th1 tales como IL-12p70, IL-2 e IFN- γ , (ii) agentes que aumentan la producción de citocinas Th1 como REVLIMID (lenalidomida) (iii) agentes que suprimen los linfocitos T reguladores (por ejemplo, agentes alquilantes, tales como temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien-9-carboxamida), ciclofosfamida ((RS)-N, N-bis (2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina 2-óxido), lomustina (CCNU; N-(2-cloroetil)-N-ciclohexil-N-nitrosourea), bis-cloroetilnitrosourea (BCNU), clorhidrato de melfalán (4[bis(cloroetil)amino]fenilalanina), busulfán (butano-1,4-diil-dimetanosulfonato), mecloretamina (mostaza nitrogenada), clorambucilo, ifosfamida, estreptozocina, dacarbazina (DTIC), tiotepa, altretamina (hexametilmelamina), cisplatino, carboplatino y oxalplatino) y (iv) agentes que estimulan la respuesta inmunitaria mediada por células (por ejemplo, ipilimumab, tremelimumab, MDX-1106, MK-3475, AMP-224, pidilizumab y MDX-1105). Los agentes estimulantes de Th1 preferidos para la administración conjunta con un virus oncolítico competente en la replicación de la invención incluyen IFN- γ

(preferentemente recombinante) y temozolomida. El virus oncolítico competente en la replicación de la invención y un agente estimulante de Th1 pueden ser por separado, administrado concurrente o consecutivamente a un sujeto con cáncer para tratar el cáncer de acuerdo con la divulgación. En una realización, el agente estimulante e Th1 se administra al sujeto y luego se administra el virus oncolítico competente en la replicación. En otras realizaciones relacionadas, se proporciona una composición o kit que comprende (i) un agente estimulante de Th1 y (ii) un adenovirus oncolítico competente en la replicación que expresa uno o más agonistas de los receptores estimulantes de células inmunitarias como se describe en el presente documento, cada uno en una cantidad efectiva para tratar el cáncer en un sujeto en combinación con el otro. En una realización preferida, la composición o kit comprende (i) un agente estimulante e Th1 seleccionado del grupo que consiste en: IFN- γ recombinante, temozolomida, CCNU, BCNU, clorhidrato de melfalán y busulfán y (ii) un adenovirus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, Delta-24 o Delta-24-RGD) que expresa un agonista de OX40 (por ejemplo, OX40L).

En ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) que expresa un antagonista de PD-L1 y/o PD-1. En algunas realizaciones relacionadas de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación expresa un antagonista de PD-L1 o PD-1 además de expresar un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias. En otras realizaciones de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación expresa un antagonista de PD-L1 o PD-1 pero no expresa un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias. Se ha identificado a PD-L1 como un regulador negativo de los linfocitos T antitumorales y se expresa en hasta el 50 % del cáncer humano. La unión de PD-L1 en células tumorales a PD-1 en linfocitos T efectores activados da como resultado la activación de la cascada de señalización de la quinasa PI3 que a su vez bloquea la producción de mediadores citotóxicos necesarios para matar células tumorales. Como se usa en el presente documento, un antagonista de PD-L1 o PD-1 es una molécula que interrumpe la interacción entre PD-L1 y PD-1. En un aspecto, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus que comprende ácido nucleico heterólogo que codifica un antagonista de PD-L1 o PD-1 insertado en una región no esencial del genoma de adenovirus. En aspectos relacionados de la divulgación, el ácido nucleico heterólogo codifica un anticuerpo anti-PD-L1 tal como MPDL3280A, o un anticuerpo anti-PD-1, tal como nivolumab o lambrolizumab. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un antagonista de PD-L1 o PD-1, tal como los descritos en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0217401, 20110195068 y 20120251537 y la patente de Estados Unidos n.º 8.217.149. En ciertas realizaciones de la divulgación, se proporciona un procedimiento para tratar el cáncer (por ejemplo, un glioma) en un ser humano que comprende administrar una cantidad eficaz de un virus oncolítico competente en la replicación que expresa un antagonista PD-L1 y/o PD-1. En una realización preferida, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus que expresa un antagonista de PD-L1 y/o PD-1. En una realización preferida, el adenovirus es el adenovirus Delta-24 o Delta-24-RGD.

En determinadas realizaciones, el virus oncolítico competente en la replicación, además de expresar un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias, también expresa uno o más antígenos tumorales en su superficie. En ciertos aspectos, 1, 2, 3, 4 o 5 antígenos se expresan en la superficie del virus, por ejemplo, insertando ácido nucleico que codifica cada antígeno en un gen separado que codifica una proteína de superficie de adenovirus. En una realización preferida, los antígenos asociados al tumor son EGFRvIII (variante del receptor del factor de crecimiento epidérmico III) y/o NY-ESO-1 (carcinoma 1 de células escamosas esofágico de Nueva York). Los antígenos tumorales pueden expresarse como parte de la cápside o la fibra, o producirse como proteínas exógenas unidas a proteínas relacionadas con la autofagia, tal como LC3, para aumentar la presentación de la proteína exógena durante la infección y replicación adenoviral. Orientar a múltiples antígenos ayudará a generar una respuesta inmunitaria consistente y efectiva.

Los antígenos asociados a tumores (TAA) incluyen, pero sin limitación, antígenos asociados a tumores que se han identificado que se producen en pacientes con cánceres cerebrales, tales como gliomas, ejemplos representativos de los cuales incluyen: AIM2 (ausente en el melanoma 2), IMC1 (oncogén de dedo anular polycomb IMC1), COX-2 (ciclooxygenasa-2), TRP-1 (proteína relacionada con la tirosina 2) TRP-2 (proteína relacionada con la tirosina 2), GP100 (glicoproteína 100), EGFRvIII (variante III del receptor del factor de crecimiento epidérmico), EZH2 (potenciador del homólogo zeste 2), 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 (HMG-box 2 relacionado con SRY), ART1 (antígeno reconocido por los linfocitos T 1), ART4 (antígeno reconocido por los linfocitos T 4), SART1 (antígeno 1 de carcinoma de células escamosas reconocido por los linfocitos T), SART2, SART3, B-ciclina, b-catenina, Gli1 (homólogo 1 de oncogén asociado a glioma), Cav-1 (caveolina-1), cathepsina B, CD74 (grupo de diferenciación 74), E-cadherina (adhesión dependiente de calcio epitelial), EphA2/Eck (receptor de EPH A2/quinasa epitelial), Fra-1/Fosl 1 (antígeno 1 relacionado con fos), GAGE-1 (antígeno G 1), gangliósido/GD2, GnT-V, β 1,6-N (acetilglucosaminiltransferasa-V), Her2/neu (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), Ki67 (antígeno del anticuerpo Ki67 asociado a la proliferación nuclear), Ku70/80 (subunidades de proteínas del heterodímero Ku humano), IL-13Ra2 (subunidad alfa 2 del receptor de interleucina-13), MAGE-A (antígeno a1 asociado a melanoma), MAGE-A3 (antígeno 3 asociado a melanoma), NY-ESO-1 (carcinoma 1 de células escamosas esofágicas de Nueva York), MART-1 (antígeno de melanoma reconocido por los linfocitos T), PROX1 (proteína prospero de homeobox 1), PSCA (antígeno prostático de células madre), SOX10 (HMG-box 10 relacionado con SRY), SOX11, Survivina, UPAR (receptor activador de plasminógeno de tipo uroquinasa, y WT-1 (proteína tumoral de Wilms 1). El virus oncolítico competente en la replicación (por ejemplo, adenovirus) puede expresar el antígeno asociado a tumor de longitud completa o un péptido inmunogénico del mismo.

En un aspecto, el virus oncolítico competente en la replicación, además de expresar un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias, también expresa EGFRvIII o un péptido inmunogénico del mismo en su superficie. La secuencia de EGFRvIII se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.455.498. Los péptidos EGFRvIII inmunogénicos incluyen 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. Preferentemente, el virus oncolítico es un adenovirus y EGFRvIII o un péptido inmunogénico del mismo se inserta en el gen que codifica la proteína de la fibra, preferentemente en el bucle HI. El ácido nucleico que codifica EGFRvIII o un péptido inmunogénico del mismo se puede insertar en los genes que codifican una o más proteínas de superficie de cualquier adenovirus. La expresión "péptido EGFRvIII inmunogénico" como se usa en el presente documento significa un péptido de longitud adecuada, por ejemplo de al menos 10 o 12 aminoácidos y hasta 15, 20, 25 o 30 aminoácidos o más que abarca la unión de corte y empalme mutada de la proteína EGFRvIII correspondiente, preferentemente EGFRvIII humano. En una realización preferida, el ácido nucleico insertado en una proteína de superficie de adenovirus codifica un péptido de 8-20 aminoácidos que consiste en, que consiste esencialmente en, o que comprende la secuencia EKKGNVYV. En una realización particularmente preferida, el péptido inmunogénico EGFRvIII es LEEKKGNVYVT (SEQ ID NO: 4) y se inserta en el gen que codifica la proteína de fibra, preferentemente en el bucle HI. En otras realizaciones, el ácido nucleico que codifica el dominio extracelular EGFRvIII completo se inserta en un gen que codifica una proteína de superficie del adenovirus.

En un aspecto relacionado de la divulgación, el virus oncolítico competente en la replicación, además de expresar un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias, por ejemplo, OX40L (gp34), también expresa NY-ESO-1 (GenBank U87459.1) o un péptido inmunogénico del mismo (por ejemplo, SLLMWITQCFLPVF) en su superficie. En un aspecto relacionado de la invención, el virus oncolítico competente en la replicación, además de expresar un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias, es decir, OX40L (gp34), también expresa NY-ESO-1 (GenBank U87459.1) o un péptido inmunogénico del mismo (por ejemplo, SLLMWITQCFLPVF) en su superficie. Preferentemente, el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus y el ácido nucleico que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunogénico del mismo se inserta en un gen que codifica una proteína de superficie, por lo que el adenovirus expresa una proteína de superficie química que comprende el NY-ESO-1 o un péptido inmunogénico del mismo. En un aspecto, el ácido nucleico que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunogénico del mismo se inserta en la región hipervariable 5 del gen que codifica el hexón del adenovirus.

La inserción de ácidos nucleicos que codifican los antígenos tumorales en los genes de adenovirus se debe hacer "en el marco" de manera que el virus exprese el antígeno tumoral en su superficie.

Ciertos aspectos no requieren la resección completa del tumor, lo cual es un factor limitante en el reclutamiento de pacientes en otros enfoques. Adicionalmente, ciertos aspectos de los procedimientos y composiciones actuales tienen el potencial de generar memoria en el sistema inmunitario y prevenir o reducir la probabilidad de recurrencia tumoral.

El término "competente en la replicación" se refiere a cualquier vector viral que no sea deficiente en ninguna función genética requerida para la replicación viral en células o tejidos específicos. El vector debe ser capaz de replicarse y empaquetarse, pero podría replicarse solo condicionalmente en células o tejidos específicos. Los vectores adenovirales competentes en la replicación de la presente invención se diseñan tal como se describe en el presente documento para reducir o eliminar su capacidad de replicarse en células normales al tiempo que conservan su capacidad de replicarse eficazmente en tipos de células de enfermedades tumorales específicas. Típicamente, un adenovirus competente en la replicación comprende suficientes regiones E1, E2, y E4 que el adenovirus es capaz de replicarse y empaquetarse sin la necesidad de elementos de suministro en trans.

La expresión "beneficio terapéutico" o "tratamiento" se refiere a cualquier cosa que promueva o mejore el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de su afección, que incluye el tratamiento del precáncer, cáncer y enfermedades hiperproliferativas. Una lista de ejemplos no exhaustivos de esto incluye la prolongación de la vida de los sujetos cualquier período de tiempo, disminución o retraso en el desarrollo neoplásico de la enfermedad, disminución de la hiperproliferación, reducción del crecimiento tumoral, retraso de la metástasis, reducción de la tasa de proliferación de células cancerosas o tumorales, y disminución del dolor en el sujeto que puede atribuirse a la afección del sujeto.

Un "linfocito T regulador" o "linfocito T regulador" se refiere a una célula que puede inhibir una respuesta de linfocitos T. Los linfocitos T reguladores expresan el factor de transcripción Foxp3, que no se regula por aumento con la activación de los linfocitos T y discrimina los linfocitos T reguladores de las células efectoras activadas. Los linfocitos T reguladores se identifican por los marcadores de superficie celular CD25, CD45RB, CTLA4 y GITR. El desarrollo de linfocitos T reguladores es inducido por la actividad de las células supresoras mieloides. Se han identificado varias subpoblaciones de linfocitos T reguladores que tienen la capacidad de inhibir las respuestas inflamatorias autoinmunes y crónicas y de mantener la tolerancia inmune en los huéspedes portadores de tumores. Estas subpoblaciones incluyen linfocitos T reguladores de tipo 1 (Tr1) que regulan la interleucina 10- (IL-10-), linfocitos T colaboradores de tipo 3 (Th3) que secretan factor de crecimiento transformante-β- (TGF-β-) y Tregs "naturales" CD4+/CD25+ (Tm) (Fehervari y Sakaguchi). J. Clin. Invest. 2004, 114: 1209-1217; Chen y col. Science. 1994, 265: 1237-1240; Groux y col. Nature. 1997, 389: 737-742).

Como se usa en el presente documento, un "agonista", por ejemplo, un agonista de OX40, es una molécula que mejora

la actividad biológica de su objetivo, por ejemplo, OX40. En ciertos aspectos, los agonistas de OX40, que comprenden, por ejemplo, composiciones de anticuerpos anti-OX40 o de ligando OX40, mejoran sustancialmente la actividad biológica de OX40. De forma deseable, la actividad biológica aumenta en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso 100 %. En ciertos aspectos, los agonistas de OX40 como se desvelan en el presente documento incluyen moléculas de unión a OX40, por ejemplo, polipéptidos de unión, anticuerpos anti-OX40, OX40L, o fragmentos o derivados de estas moléculas.

A lo largo de la presente solicitud se tratan otras realizaciones de la invención. Cualquier realización tratada con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención y viceversa. Se entiende que cada realización descrita en el presente documento son realizaciones de la invención que son aplicables a todos los aspectos de la invención. Se contempla que cualquier realización tratada en el presente documento se puede implementar con respecto a cualquier composición de la invención y al contrario. Adicionalmente, las composiciones de la invención pueden usarse para lograr los procedimientos de la invención.

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

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

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para decir "y/o", a menos que se indique explícitamente que se refiera solo a alternativas o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición de que se refiere solo a alternativas y "y/o".

Como se usa en esta especificación y reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o etapas del procedimiento no citados y adicionales.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada siguiente. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan solamente como ilustración, dado que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Construcción de un nuevo adenovirus que expresa el agonista del receptor estimulante de células inmunitarias OX40L. Se muestra la estructura genética de Delta-24-RGD-OX40L. En resumen, se eliminaron aproximadamente 2,7 kb de la región E3 no esencial, de 78,3 a 85,8 unidades de mapa, de Delta-24-RGD y se introdujo un sitio único de enzimas de restricción. A continuación se insertó un casete de expresión para el ADNc de OX40L de ratón dirigido por el promotor de CMV en la región E3 delecionada del genoma adenoviral utilizando el sitio de restricción único. En otra construcción, el ADNc que codifica el OX40L de ratón se insertó corriente abajo del gen de la fibra del genoma adenoviral y la expresión de OX40L fue impulsada por el promotor tardío endógeno de adenovirus.

FIG. 2. Expresión de OX4L de ratón (mOX40L) por Delta-24-RGD-OX40L (denominado D24-RGDOX en la figura) en células GL261 de glioma de ratón. Las células GL261 se infectaron con los virus indicados a 50 ufp/célula. Después de 48 horas, las células se tiñeron con anticuerpo α -mOX40L (dilución 1:100). La integridad de la membrana celular se controló con tinción con homodímero de etidio-1 (8 μ M). Las células teñidas se analizaron con citometría de flujo. Los números en las esquinas inferiores derechas indican el porcentaje de células que expresan mOX40L.

FIG. 3. Expresión de OX40L de ratón (mOX40L) por D24-RGDOX en células B16 de melanoma de ratón. Los procedimientos fueron los mismos que los descritos para la Figura 2.

FIG. 4. Expresión *in vivo* de OX40L de ratón (mOX40L) por D24-RGDOX en células de xenoinjerto. Se inyectaron células GL261-EGFP (5 x 10⁴ células) por vía intracraneal en ratones C57BL/6 y 12 días después se inyectaron por vía intratumoral D24-RGDOX o D24-RGD (5 x 10⁷ ufp). 3 días después de la inyección, los tumores se cosecharon y se disociaron y las células se tiñeron con anticuerpo monoclonal de rata α -mOX40L (dilución 1:40). Las células teñidas se analizaron con citometría de flujo. Los números en las esquinas superiores derecha indican el porcentaje de células tumorales que expresan mOX40L.

FIG. 5. Replicación de D24-RGD y D24-RGDOX en células U-87 MG o GL261. Las células se infectaron con los virus a 10 ufp/célula. 48 horas después de la infección, la progenie viral infecciosa se tituló y los títulos virales finales se determinaron como ufp/ml.

FIG. 6. D24-RGD y D24-RGDOX inducen la liberación de HMGB1. Las células GL261 se infectaron con los virus indicados a 200 ufp/célula. 24 horas después, la concentración de FBS se redujo del 10 % al 2 %. El medio de cultivo (M) y los lisados de células enteras (W) se recogieron en los puntos de tiempo indicados y los niveles de expresión de HSP90 y HMGB1 se analizaron con inmunotransferencia. Los niveles relativos de HMGB1 en el medio se muestran en la parte inferior del panel.

FIGS. 7A-C. D24-RGDOX mejora la inmunidad anti-glioma. Figura 7A: Se implantaron células GL261 en el cerebro de ratones C57BL/6. Los animales se separaron al azar por grupos ($n = 10$) y se trataron (mediante inyección intratumoral) con PBS, D24-RGDOX (5×10^7 ufp), D24-RGD (5×10^7 ufp), OX86 (anticuerpo anti-OX40 de ratón) (25 μ g), o D24-RGD en combinación con OX86 (5×10^7 ufp + 25 μ g respectivamente). Los animales que muestran síntomas generalizados o locales de la enfermedad fueron sacrificados. Figura 7B: Las células de un clon seleccionado de GL261, caracterizado por una tasa de crecimiento más lenta, fueron implantadas en el cerebro de ratones C57BL/6. Los estudios de supervivencia se realizaron después del tratamiento con control (PBS) o D24-RGDOX. Figura 7C: Se realizó un experimento similar al de la Figura 7A en un modelo de ratón inmunodeficiente. En este modelo, D24-RGDOX no aumentó la supervivencia de ratones portadores de glioma intracraneal.

FIG. 8. El tratamiento con D24-RGDOX produce un mayor reclutamiento de células inmunitarias en el lecho tumoral que D24-RGD. Se administraron PBS, D24-RGD o D24-RGDOX por vía intratumoral después de la implantación intracraneal de células GL261. El día 14 del experimento, se extirparon y analizaron los cerebros. Los leucocitos de hemisferios frescos que contienen tumores se aislaron y analizaron con citometría de flujo. Se indican los valores de P (prueba t de Student, doble cola).

FIG. 9. D24-RGDOX mejora la respuesta inmunitaria contra las células tumorales. Los tumores se establecieron como en la Figura 8. D24-RGD o D24-RGDOX (5×10^7 ufp) se inyectaron por vía intratumoral los días 6, 8 y 10 después de la implantación del tumor. El día 14 después de la implantación del tumor, se aislaron los esplenocitos de bazo de ratón (grupo de 5 ratones) y leucocitos infiltrados en el cerebro (BIL) de cada tratamiento. Se incubaron 2×10^4 células objetivo (MBC (células cerebrales de ratón), GL261-OVA, GL261-OVA + D24RGD o GL261-OVA + RGDOX) prefijadas con paraformaldehído al 1 % con 5×10^4 BIL o 5×10^5 esplenocitos por pocillo durante 40 horas y la concentración de IFN γ en el sobrenadante se evaluó con ELISA estándar.

FIGS. 10A-B. Activación de linfocitos y esplenocitos infiltrados en el cerebro. Figura 10A: Los esplenocitos infiltrados en el cerebro se aislaron de los ratones de cada grupo de tratamiento el día 21 después de la implantación del tumor y se cultivaron conjuntamente con las MBC como se describe en la Figura 9. Figura 10B: Los esplenocitos se aislaron de los ratones de cada grupo de tratamiento el día 21 después de la implantación del tumor y se cultivaron de forma conjunta con las células objetivo indicadas como se describe en la Figura 9. Cuarenta horas después, la concentración de IFN γ en el sobrenadante se evaluó con ELISA estándar.

FIG. 11. Gráfico que demuestra la expresión de OX40L en células huésped infectadas después de la infección con Delta-24-RGD-OX40L (referido como Delta-24-RGDOX en la figura). Las células HeLa (adenocarcinoma epidérmico cervical humano) se infectaron con Delta-24-RGD-OX40L, construido de acuerdo con la figura 1, a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 50 ufp/célula. En resumen, las reservas virales se diluyeron al m.o.i. indicado, se añadieron a monocapas celulares (placa de 0,5 ml/60 mm o placa de 5 ml/100 mm) y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos con agitación breve cada 5 minutos. Después de esto, se añadió la cantidad necesaria de medio de cultivo y las células se devolvieron a la incubadora durante el tiempo prescrito. 48 horas después de la infección con el virus, las células se tiñeron con anticuerpo contra mOX40L y el porcentaje de células que expresaban mOX40L se analizó por citometría de flujo. Las células muertas se excluyeron usando tinción con EthD-1 (FL3-H). Las células positivas para mOX40L se ilustran en el cuadrante inferior derecho. Las imágenes ilustran que las células infectadas con Delta-24-RGD-OX40L expresan OX40L.

FIG. 12. Gráfico que muestra la supervivencia mejorada de un modelo de glioma de ratón después del tratamiento con Delta-24-RGD-OX40L (denominado Delta-24-RGDOX en la figura). Los datos se presentan como la curva de Kaplan-Meier de la supervivencia general. En resumen, Se implantaron células GL261 (5×10^4) en el cerebro de ratones C57BL/6 como se describe en Fuego y col., J. Natl. Cancer Inst., 95:652-660 (2003). Los días 3, 6 y 8 después de la implantación de células tumorales, los ratones se separaron al azar por grupos ($n = 10$) y se les inyectó por vía intratumoral 10 μ l de soluciones que contenían (1) Delta-24-RGD (10^8 ufp/dosis), (2) Delta-24-RGDOX (10^8 ufp/dosis) (3) anticuerpo OX40L (25 μ g/dosis), (4) Delta-24-RGD en combinación con el anticuerpo OX40L (10^8 ufp/dosis + 25 mg/dosis respectivamente) o (5) PBS como tratamiento simulado. Los animales que muestran síntomas generalizados o locales de la enfermedad fueron sacrificados. El 100 % de los ratones tratados con Delta-24-RGD-OX40L (Delta-24-RG-DOX) estaban libres de enfermedad después de 20 días, mientras que todos los ratones tratados con PBS (control) y todos los ratones tratados con Delta-24-RGD fueron sacrificados el día 17. El 50 % de los ratones tratados con OX-40L estaban libres de enfermedad después de 20 días. Es importante destacar que los ratones tratados con Delta-24RGD-OX40L exhibieron una supervivencia mejorada en relación con el grupo que recibió tratamientos separados con el anticuerpo Delta-24-RGD y OX40L.

FIG. 13. Gráfico que muestra la respuesta TH1 mejorada en un modelo de glioma de ratón después del tratamiento con Delta-24-RGD-OX40L (denominado Delta-24-RGDOX en la figura). Se implantaron células GL261 en el cerebro de ratones C57BL/6. Los ratones fueron tratados con inyecciones intratumorales de Delta-24-GFP o Delta-

24-RGD-OX40L (días 7, 9, 11 después de la implantación de células tumorales). El día 14, se recogieron los esplenocitos de ratón de 3-5 ratones por grupo y se incubaron con fibroblastos embrionarios de ratón de tipo salvaje (wtMEF), células GL261 o GL261 infectadas con Delta-24-RGD durante 40 horas. La concentración de IFN γ secretado por los esplenocitos, como indicador de activación de esplenocitos, se midió mediante ELISA. El panel inferior muestra resultados similares representados en el panel superior para los dos primeros grupos del experimento, usando un rango de escala diferente. Estos datos demuestran que el tratamiento con Delta-24-RGD-OX40L mejora la respuesta inmunitaria TH1 al tumor en el modelo de ratón. Además, estos datos demuestran que, además de iniciar la inmunidad contra el adenovirus, los ratones portadores de glioma tratados con Delta-24-RGD-OX40L desarrollan una respuesta celular específica contra células tumorales infectadas y no infectadas. Por consiguiente, la infección por Delta-24-RGDOX condujo al desarrollo de una respuesta inmunitaria antitumoral contra las células cancerosas, incluso si no habían sido infectadas, y sugiere que al infectar a una minoría de células tumorales, Delta-24-RGDOX provocará una respuesta inmunitaria potencialmente capaz de erradicar el tumor.

Descripción

Los procedimientos y composiciones de la presente invención incluyen la construcción y verificación de virus oncolíticos (por ejemplo, adenovirus) que comprenden ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias, es decir, OX40L (gp34), que exhibe efectos antitumorales mejorados e incluso sinérgicos en comparación con el virus oncolítico no modificado (es decir, un virus oncolítico genéticamente similar o idéntico que no contiene ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias) y el agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias cuando se administra por separado.

I. Virus oncolíticos competentes en la replicación

Los virus oncolíticos competentes en la replicación que expresan uno o más agonistas de los receptores estimulantes de células inmunitarias, tales como OX40L (gp34) según la presente invención, incluyen cualquier virus oncolítico de origen natural (por ejemplo, de una "fuente de campo" o competente en la replicación. El virus oncolítico, además de expresar uno o más agonistas de los receptores estimulantes de las células inmunitarias, puede, por ejemplo, modificarse para aumentar la selectividad del virus para las células cancerosas.

Los virus oncolíticos competentes en la replicación según la invención incluyen, pero sin limitación, virus oncolíticos que son miembros de la familia de los myoviridae, siphoviridae, podpviridae, tecoviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxyviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adnoviridae, papovaviridae, polydnviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramixoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, ortomixoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, calciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae y barnaviridae.

Los ejemplos particulares de virus oncolíticos competentes en la replicación para su uso en la práctica de la invención incluyen adenovirus, retrovirus, reovirus, rhabdovirus, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus del polio, virus vaccinia, virus del herpes simple, picornavirus, virus coxsackie y parvovirus.

En una realización, el virus oncolítico competente en la replicación es un rhabdovirus seleccionado de un virus de estomatitis vesicular (VSV) y una cepa Maraba, opcionalmente modificado para aumentar la selectividad para el cáncer. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, mutaciones en el gen de la matriz (M) que hacen que el virus sea susceptible a una respuesta de IFN del huésped.

En otra realización, el virus oncolítico competente en la replicación es un virus vaccinia, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen las cepas Western Reserve, Wyeth y Copenhagen opcionalmente modificadas para aumentar la selectividad para el cáncer. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación: gen de timidina quinasa no funcional, gen del factor de crecimiento vaccinia no funcional y gen de unión a interferón tipo 1 no funcional.

En otro aspecto, el virus oncolítico competente en la replicación se selecciona de un virus del herpes simple (HSV) (tal como HSV-1 o HSV1716) y un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

Los adenovirus son virus oncolíticos competentes en la replicación particularmente preferidos.

El adenovirus (Ad) es un virus de ADN grande (~ 36 kb) que infecta a seres humanos, pero que muestran una amplia gama de huéspedes. 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 basadas en criterios moleculares, inmunológicos y funcionales. En la edad adulta, prácticamente todos los seres humanos han sido infectados con los serotipos de adenovirus más comunes, siendo el principal efecto síntomas similares a los del resfriado.

La infección adenoviral de las células huésped da como resultado que el ADN adenoviral se mantenga episomalmente, lo que reduce la potencial genotoxicidad asociada con la integración de vectores. Asimismo, los adenovirus son estructuralmente estables y no se han detectado reordenamientos del genoma después de una extensa amplificación.

Los adenovirus pueden infectar a casi todas las células epiteliales independientemente de su etapa del ciclo celular. Hasta el momento, la infección por adenovirus parece estar vinculada solamente a una enfermedad leve, tal como la enfermedad respiratoria aguda en seres humanos

Los miembros de cualquiera de los 57 serotipos de adenovirus humanos (HAdV-1 a 57) pueden incorporar ácido nucleico heterólogo que codifica un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias de acuerdo con la invención. Ad5 humano está bien caracterizado genéticamente y bioquímicamente (GenBank M73260; AC_000008). Por consiguiente, en una realización preferida, el adenovirus oncolítico es un serotipo Ad5 competente en la replicación o un serotipo híbrido que comprende un componente Ad5. El adenovirus puede ser una cepa de tipo salvaje, pero, preferentemente, se modifica genéticamente para mejorar la selectividad tumoral, por ejemplo, atenuando la capacidad del virus para replicarse dentro de las células inactivas normales sin afectar a la capacidad del virus para replicarse en las células tumorales. Los ejemplos no limitantes de adenovirus oncolíticos competentes en la replicación abarcados 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 de virus de serotipo Ad2 y Ad5 con deleciones en las regiones E1B-55K y E3B para mejorar la selectividad para el 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 reemplazo del promotor E1A por un promotor E2F. ColoAd1 es un serotipo Add11p/Ad3 quimérico. AD5/3-D24-GMCSF (CGTG-102) es un adenovirus de cápside modificada de serotipo 5/3 que codifica GM-CSF (el botón de la proteína de la cápside de Ad5 se reemplaza con un dominio de botón del serotipo 3).

En una realización particularmente preferida, el adenovirus oncolítico competente en la replicación es Delta-24 o Delta-24-RGD. Delta-24 se describe en la publicación 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 porción CR2 del gen E1A que abarca el área responsable de la unión de la proteína Rb (nucleótidos 923-946) correspondiente a aminoácidos 122-129 en la proteína E1A codificada (Fueyo J y col., *Oncogene*, 19:2-12 (2000)). Delta-24-RGD comprende además una inserción de la secuencia RGD-4C (que se une fuertemente a las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$) en el bucle HI de la proteína del botón de fibra (Pasqualini R. y col., *Nat Biotechnol*, 15:542-546 (1997)). La delección de E1A aumenta la selectividad del virus para las células cancerosas; La secuencia RGD-4C aumenta la infectividad del virus en los gliomas.

Los adenovirus oncolíticos inyectados en un tumor inducen la muerte celular y la liberación de una nueva progenie de adenovirus que, infectando las células vecinas, genera una ola de tratamiento que, si no se detiene, puede conducir a la destrucción total del tumor. Se han demostrado efectos antitumorales significativos de Delta-24 en sistemas de cultivo celular y en modelos de xenoinjerto de glioma maligno. Delta-24-RGD ha demostrado sorprendentes efectos antitumorales en un ensayo clínico de fase 1 y actualmente es objeto de ensayos clínicos adicionales. Aunque la lisis de las células tumorales es el principal mecanismo anticanceroso propuesto para el adenovirus oncolítico Delta-24-RGD, los datos del ensayo clínico de fase 1 en pacientes con glioma recurrente y otras observaciones indican que el efecto oncolítico directo puede potenciarse por el desencadenante de la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por adenovirus. Por consiguiente, aproximadamente el 10% de los pacientes tratados con Delta-24-RGD mostraron una infiltración del tumor por las células inmunitarias que en ciertos casos es bastante masiva. En estos casos, representando una pequeña minoría de los tratados, se observó una respuesta inmunitaria predominantemente Th1 que parece correlacionarse con una respuesta antitumoral óptima. Los aspectos de la presente invención están dirigidos a mejorar esta eficacia antitumoral en la mayoría de los pacientes. El adenovirus oncolítico competente en la replicación de la invención está diseñado para lograr esto (i) mejorando la respuesta inmunitaria Th1 contra los antígenos adenovirales y tumorales y (2) invirtiendo el entorno inmunodepresor del tumor. La administración del adenovirus oncolítico de la invención conduce a la activación de la población de linfocitos que reconocen las células cancerosas con o sin infección por virus y, en consecuencia, proporciona un efecto antitumoral mejorado y prolongado que persiste incluso después de erradicar el virus. Además, la activación de los receptores estimulantes de las células inmunitarias, tal como OX40, conduce a una disminución en el número y el estado de activación de los linfocitos T reguladores que desempeñan un papel en el mantenimiento del ambiente inmunodeprimido de los tumores. El adenovirus oncolítico de la invención proporciona una ventaja significativa en comparación con la administración por separado del adenovirus y el agonista del receptor estimulante de las células inmunitarias al localizar el agonista en el sitio del tumor, reduciendo así los efectos secundarios no deseados que acompañan a la administración sistémica del agonista.

El ciclo infeccioso del adenovirus se realiza en 2 etapas: la fase temprana que precede al inicio de la replicación del genoma adenoviral y que permite la producción de proteínas reguladoras y proteínas implicadas en la replicación y transcripción del ADN viral, y la fase tardía que conduce a la síntesis de las proteínas estructurales. Los genes tempranos se distribuyen en 4 regiones que están dispersas en el genoma adenoviral, designadas E1 a E4 (E indica "temprano"). Las regiones tempranas comprenden al menos seis unidades de transcripción, cada una de las cuales posee su propio promotor. La expresión de los genes tempranos está regulada en sí misma, expresándose algunos genes antes que otros. Tres regiones, E1, E2 y E4 son esenciales para la replicación del virus. Por consiguiente, si un adenovirus es defectuoso para una de estas funciones, esta proteína tendrá que ser suministrada en trans, o el virus no puede replicarse.

La región temprana E1 se encuentra en el extremo 5' del genoma adenoviral y contiene 2 unidades de transcripción viral, E1A y E1B. Esta región codifica proteínas que participan muy temprano en el ciclo viral y son esenciales para la

expresión de casi todos los otros genes del adenovirus. En particular, la unidad de transcripción E1A codifica una proteína que transactiva la transcripción de los otros genes virales, induciendo la transcripción desde los promotores de las regiones E1B, E2A, E2B, E3, E4 y los genes tardíos. Típicamente, las secuencias exógenas se integran en lugar de toda o parte de la región E3

5 El adenovirus entra en la célula huésped permisiva a través de un receptor de superficie celular y luego se internaliza. El ADN viral asociado con ciertas proteínas virales 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 adenoviral tiene lugar en el núcleo de las células infectadas y no requiere replicación celular. Se ensamblan nuevas partículas virales o viriones, tras lo cual se liberan de las células infectadas y pueden infectar a otras células permisivas.

10 El adenovirus es un sistema de administración atractivo. Las realizaciones de la invención pueden utilizar un proceso de células en suspensión con rendimientos promedio de 1×10^{16} partículas virales por lote. El proceso puede estar libre o esencialmente libre de proteínas, suero y componentes derivados de animales que lo hacen adecuado para una amplia gama de productos de vacunas profilácticas y terapéuticas.

Varios factores favorecen el uso de adenovirus oncolíticos para el tratamiento de tumores cerebrales. En primer lugar, los gliomas suelen estar localizados y, por lo tanto, un enfoque local eficiente debería ser suficiente para curar la enfermedad. En segundo lugar, los gliomas albergan varias poblaciones de células que expresan diferentes anomalías genéticas. Por consiguiente, el espectro de tumores sensibles a la transferencia de un solo gen a las células cancerosas puede ser limitado. En tercer lugar, los adenovirus competentes en la replicación pueden infectar y destruir las células cancerosas que son detenidas en G0. Dado que los gliomas incluyen invariablemente células no ciclables, esta propiedad es importante. Por último, la vía de p16-Rb es anormal en la mayoría de los gliomas, haciendo que el adenovirus Delta-24 sea particularmente efectivo para tratar estos tumores, aunque la pérdida de la función del gen supresor tumoral del retinoblastoma se ha asociado con las causas de varios tipos de tumores y no se limita al tratamiento de gliomas.

Si un adenovirus ha sido mutado para que sea condicionalmente replicativo (competente en la replicación bajo ciertas condiciones), se puede requerir una célula auxiliar para la replicación viral. Cuando sea necesario, las líneas celulares auxiliares pueden derivarse de células humanas, tales como células de riñón embrionario humano, células musculares, células hematopoyéticas u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden derivar de las células de otras especies de mamíferos que son permisivas para adenovirus humano. Dichas células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias de mono. En ciertos aspectos, una línea celular auxiliar es 293. Se pueden encontrar varios procedimientos de cultivo de células huésped y auxiliares en la técnica, por ejemplo, Racher y col., 1995.

En ciertos aspectos, el adenovirus oncolítico es competente para la replicación en células con una vía Rb mutante. Después de la transfección, las placas adenovirales se aíslan de las células con recubrimiento de agarosa y las partículas virales se expanden para su análisis. Para protocolos detallados, el experto en la materia se refiere a Graham y Prevec, 1991.

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

40 El adenovirus es fácil de cultivar y manipular y exhibe una amplia gama de huéspedes *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus se puede obtener en títulos altos (por ejemplo, más de 10^9 unidades formadoras de placa (ufp) por ml) y son altamente infecciosos. El ciclo de vida del adenovirus no requiere integración en el genoma de la célula huésped.

Las modificaciones del adenovirus oncolítico descritas en el presente documento pueden realizarse para mejorar la capacidad del adenovirus oncolítico para tratar el cáncer. Tales modificaciones de un adenovirus oncolítico han sido descritas por Jiang y col. (Curr Gene Ther. 2009 Oct 9 (5): 422-427), véase también la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 20060147420.

La ausencia o la presencia de niveles bajos del virus coxsackie y el receptor de adenovirus (CAR) en varios tipos de tumores pueden limitar la eficacia del adenovirus oncolítico. Se pueden añadir varios motivos peptídicos al botón de fibra, por ejemplo, un motivo RGD (las secuencias RGD imitan los ligandos normales de las integrinas de la superficie celular), motivo Tat, motivo de polilisina, motivo NGR, motivo CTT, motivo CNGRL, motivo CPRECES o motivo de marcador de estreptococos (Rouslahti y Rajotte, 2000). Se puede insertar un motivo en el bucle HI de la proteína de fibra de adenovirus. La modificación de la cápside permite la infección de células objetivo independiente de CAR. Esto permite una mayor replicación, una infección más eficiente y un aumento de la lisis de las células tumorales (Suzuki y col., 2001). También se pueden añadir secuencias peptídicas que se unen a receptores específicos de glioma humano como EGFR o uPR. Los receptores específicos que se encuentran exclusiva o preferentemente en la superficie de las células cancerosas pueden usarse como objetivo para la unión e infección por adenovirus, tal como EGFRvIII.

II. Casetes de expresión

En determinadas realizaciones de la presente invención, los procedimientos expuestos en el presente documento implican secuencias de ácido nucleico que codifican un agonista del receptor estimulante de células inmunitarias en el que el ácido nucleico está comprendido en un "casete de expresión". La expresión "casete de expresión" pretende incluir cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico que codifica un producto génico en el que parte o la totalidad de la secuencia que codifica el ácido nucleico puede transcribirse.

Promotores y potenciadores: para que el casete de expresión efectúe la expresión de una transcripción, el gen que codifica el ácido nucleico 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 a la que se controla el inicio y la velocidad de transcripción. Las frases "posicionado operativamente", "unido operativamente", "bajo el control," y "bajo el control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación y/o expresión transcripcional de esa secuencia. Un promotor puede o no usarse junto con un "potenciador" que se refiere a una secuencia reguladora de acción cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Cualquier promotor conocido por los expertos en la materia que estaría activo en una célula en un sujeto se contempla como un promotor que puede aplicarse en los procedimientos y composiciones de la presente invención. Un experto en la técnica estaría familiarizado con los numerosos tipos de promotores que pueden aplicarse en los presentes procedimientos 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 el presente documento para hacer referencia a cualquier promotor que sea relativamente más activo en ciertos tipos de tejido en comparación con otros tipos de tejido. Los ejemplos de promotores incluyen el promotor de CMV.

El promotor será uno que esté activo en una célula y la expresión del promotor da como resultado 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 tenga actividad en ese tipo de célula particular.

Un promotor puede ser uno asociado naturalmente con un gen o secuencia, como puede obtenerse aislando las secuencias 5 no codificantes ubicadas aguas arriba del segmento de codificación y/o exón. Tal promotor puede denominarse "endógeno". De igual manera, un potenciador puede ser uno asociado naturalmente con una secuencia de ácido nucleico, ubicado ya sea corriente abajo o corriente arriba de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán ciertas ventajas colocando el segmento de ácido nucleico codificador bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador que normalmente no está asociado 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, viral o eucariota, y los promotores o potenciadores que no son "de origen natural", es decir, que contiene 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 sintéticamente, se pueden producir secuencias usando tecnología de clonación recombinante y/o amplificación de ácido nucleico, 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 efectivamente la expresión del segmento de ADN en el tipo celular, órgano y organismo elegido para la expresión. Los expertos en el arte de la biología molecular generalmente entienden el uso de promotores, potenciadores y combinaciones de tipos celulares para la expresión de proteínas, por ejemplo, véase Sambrook y col. (2001). El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

No se cree que el promotor particular que se emplea para controlar la expresión del ácido nucleico de interés sea crítico, siempre que sea capaz de expresar el polinucleótido en la célula objetivo a niveles suficientes. Por consiguiente, cuando se apunte a una célula humana, es preferible colocar la región de codificación del polinucleótido adyacente y bajo el control de un promotor que sea capaz de expresarse en una célula humana. En términos generales, dicho promotor podría incluir un promotor humano o viral.

En diversas realizaciones, el promotor temprano inmediato del gen del citomegalovirus humano (CMV), se puede utilizar el promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous. El uso de otros promotores de fagos celulares o bacterianos virales o de mamíferos, que son bien conocidos en la técnica para lograr la expresión de polinucleótidos, también se contempla, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para producir una respuesta inmunitaria.

Los ejemplos adicionales de promotores/elementos que pueden emplearse, en el contexto de la presente invención incluyen los siguientes, que no pretende ser exhaustivo de todos los posibles elementos promotores y potenciadores, pero, simplemente, ser un ejemplo de los mismos: cadena pesada de inmunoglobulina; cadena ligera de inmunoglobulina; receptor de linfocitos T; HLA DQ α y/o DQ β ; β interferón; interleucina-2; receptor de interleucina-2; MHC de clase II; HLA-DR α de MHC de clase II; β -actina; creatina quinasa muscular (MCK); prealbúmina (transtiretina); elastasa I; metalotioneína (MTII); colagenasa; albúmina; α -fetoproteína; t-globina; β -globina; c-fos; c-HA-ras; Insulina;

molécula de adhesión de células neurales ("NCAM"); α 1-antitripsina; Histona H2B (TH2B); Colágeno de tipo I y/o de ratón; Proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78); Hormona de crecimiento de rata; Amiloide A de suero humano (SAA); Troponina I (TN I); factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); distrofia muscular de Duchenne; SV40; polioma; retrovirus; virus del papiloma; virus de la hepatitis B; virus de la inmunodeficiencia humana; citomegalovirus (CMV); y el virus de la leucemia del mono de Gibbon.

Los potenciadores se detectaron originalmente como elementos genéticos que aumentaron la transcripción de un promotor ubicado en una posición distante en la misma molécula de ADN. La distinción básica entre potenciadores y promotores es operativa. Una región potenciadora en su conjunto debe ser capaz de estimular la transcripción a distancia; esto no tiene por qué ser cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otra parte, 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 se superponen y son contiguos, a menudo parece tener una organización modular muy similar. Adicionalmente, cualquier combinación de promotor/potenciador (según la EPDB de la base de datos de promotores eucarióticos) también podría usarse para dirigir la expresión de un gen. La selección adicional de un promotor que está regulado en respuesta a señales fisiológicas específicas puede permitir la expresión inducible de una construcción. Por ejemplo, con el polinucleótido bajo el control del promotor PAI-1 humano, la expresión es inducible por el factor de necrosis tumoral. Los ejemplos de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que pueden activarse en respuesta a un estímulo específico incluyen (elemento/inductor): MT II/éster de forbol (TFA) o metales pesados; MMTV (virus de tumor mamario de ratón)/glucocorticoides; β -interferón/poli (rI) x o poli (rc); adenovirus 5 E2/E1A; colagenasa/éster de forbol (TPA); estromelina/éster de forbol (TPA); SV40/éster de forbol (TPA); gen MX murino/Interferón, virus de la enfermedad de Newcastle; gen GRP78/A23187; α -2-Macroglobulina/IL-6; vimentina/suero; gen H-2kb del MHC de clase I/ interferón; HSP70/E1A, antígeno T grande de SV40; proliferina/éster de forbol-TPA; factor de necrosis tumoral/PMA; y hormona estimulante de la tiroides, un gen/hormona tiroidea.

Señales de iniciación: una señal de iniciación específica también puede ser necesaria para la traducción eficiente de secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o las secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control traduccional exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG. Un experto en la materia sería capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias.

IRES - En ciertas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios de entrada al ribosoma (IRES) se utiliza para crear mensajes multigénicos o policistronicos. Los elementos IRES pueden evitar el modelo de escaneo de ribosomas de la traducción dependiente de Cap 5-metilada y comenzar la traducción en sitios internos. Se han descrito elementos IRES de dos miembros de la familia de los picornavirus (polio y encefalomiocarditis), así como un IRES de un mensaje de mamífero. Los elementos IRES se pueden unir a marcos de lectura abiertos heterólogos. Múltiples marcos de lectura abiertos se pueden transcribir juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistronicos (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5,925,565 y 5,935,819).

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

Señales de poliadenilación: en expresión, uno típicamente incluirá una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y/o se puede emplear cualquier secuencia de este tipo. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, conveniente y/o conocido que funciona bien en varias células objetivo. También se contempla como un elemento del casete de expresión un sitio de terminación de la transcripción. Estos elementos pueden servir para mejorar los niveles de mensajes y/o minimizar la lectura desde el casete a otras secuencias.

Otros componentes del casete de expresión: en ciertas realizaciones de la invención, las células infectadas por el vector adenoviral pueden identificarse *in vitro* incluyendo un gen indicador en el vector de expresión. En general, un indicador seleccionable es aquel que confiere una propiedad que permita la selección. Un indicador seleccionable positivo es aquel en el que la presencia del gen indicador permite su selección, mientras que un indicador seleccionable negativo es aquel en el que su presencia impide su selección. Un ejemplo de marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a medicamentos (genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol). Otros tipos de indicadores incluyen indicadores seleccionables, tales como GFP.

Las realizaciones de la invención pueden usar tecnologías actuales de plataforma adenoviral en la preparación de un ácido nucleico adenoviral que comprende un segmento de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno asociado a tumor. Los aspectos de la construcción de la vacuna adenoviral incluyen la inserción de material genético en un vector adenoviral y la confirmación de la construcción a través de la caracterización y secuenciación del ácido nucleico, virus y producto de virus. La vacuna adenoviral se somete después a una serie de estudios de viabilidad diseñados para evaluar la escalabilidad.

III. Cáncer

Los procedimientos de la presente divulgación pueden usarse para tratar cánceres. Los ejemplos específicos de tipos de cáncer incluyen, entre otros, glioma, melanoma, metástasis, adenocarcinoma, tioma, linfoma, sarcoma, cáncer broncopulmonar, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas y similares.

El término "glioma" se refiere a un tumor que se origina en la neuroglía del cerebro o la médula espinal. Los gliomas derivan de los tipos de células gliales, tales como astrocitos y oligodendrocitos, así, los gliomas incluyen astrocitomas y oligodendrogliomas, así como gliomas anaplásicos, glioblastomas y ependimomas. Los astrocitomas y los ependimomas se pueden producir en todas las áreas del cerebro y la médula espinal, tanto en niños como en adultos. Los oligodendrogliomas aparecen típicamente en los hemisferios cerebrales de los adultos. Los gliomas representan el 75 % de los tumores cerebrales en pediatría y el 45 % de los tumores cerebrales en adultos. Otros tumores cerebrales son los 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 hemopoyético, tumores de las células germinales y tumores de la región estelar. Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para tratar cualquier cáncer de cerebro.

El término melanoma incluye, aunque sin limitaciones, melanomas, melanomas metastásicos, melanomas derivados de melanocitos o células nevus relacionadas con melanocitos, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma *in situ*, melanoma de dispersión superficial, melanoma nodular, lentigo, melanoma maligno, melanoma lentiginoso acral, melanoma invasivo o síndrome de lunar y melanoma atípico familiar (FAMM). Tales melanomas en mamíferos pueden ser causados por anomalías cromosómicas, crecimiento degenerativo y trastornos del desarrollo, agentes mitogénicos, 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 carcinogénicos. Los cánceres mencionados anteriormente pueden evaluarse o tratarse mediante procedimientos de la presente invención. En el caso del cáncer, un gen que codifica un antígeno asociado con el cáncer (por ejemplo, un antígeno asociado a tumor (TAA)) puede incorporarse en el genoma del virus recombinante o una porción del mismo junto con ácido nucleico que codifica una o más moléculas agonistas del receptor estimulante de las células inmunitarias. El antígeno asociado con el cáncer puede expresarse en la superficie de una célula cancerosa, puede ser secretado o puede ser un antígeno interno.

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.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para estimular una respuesta inmunitaria antitumoral en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una composición de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, un adenovirus que expresa uno o más agonistas de los receptores estimulantes de las células inmunitarias, es decir, OX40L (gp34), y opcionalmente uno o más antígenos asociados a tumores, para su uso como medicamento se administra a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria con fines terapéuticos o profilácticos. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, la construcción de expresión se formula en una composición que es adecuada para este fin. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a composiciones que no producen efectos adversos, reacciones alérgicas u otras reacciones perjudiciales cuando se administra a un animal o humano. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, vehículos, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la materia. 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. Los principios activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones. Por ejemplo, El principio activo suplementario puede ser un agente inmunogénico adicional.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma de ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenaje y debe estar preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un 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, se pueden usar varios 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 sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede efectuar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando compuestos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos otros ingredientes como se ha enumerado anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de diversos principios 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 procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado a vacío y las técnicas de criodesecación que dan como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una de sus soluciones anteriormente esterilizadas por filtración.

Tras la formulación, las soluciones se pueden administrar de un modo compatible con la formulación de dosificación y una cantidad tal que sea terapéutica o profilácticamente eficaz. Para la administración parenteral en una solución acuosa, la solución debe tamponarse de forma adecuada, si fuera necesario, y el diluyente líquido en primer lugar se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravascular e 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.

Necesariamente se producirá alguna variación en la dosis en función de la afección del sujeto que se esté tratando. El responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir con las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridas por la FDA.

Dosificación: se determina una cantidad efectiva del agente terapéutico o preventivo en función del objetivo previsto, por ejemplo, estimulación de una respuesta inmunitaria contra un tumor. Los expertos en la materia conocen bien cómo aplicar la liberación de genes en situaciones *in vivo* y *ex vivo*. Para vectores virales, generalmente se preparará una reserva de vectores virales. Dependiendo del tipo de virus y el título alcanzable, se liberará al menos aproximadamente, como máximo 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 entre ellas, a un sujeto. En otros aspectos, los adenovirus según la invención pueden administrarse en una administración única o en administraciones múltiples. El virus puede administrarse a una dosis 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} UFP. Por ejemplo, el virus puede administrarse a una dosis de entre aproximadamente 10^7 - 10^{13} UFP, entre aproximadamente 10^8 - 10^{13} UFP, entre aproximadamente 10^9 - 10^{12} UFP o entre aproximadamente 10^8 - 10^{12} UFP.

Los virus oncolíticos competentes en la replicación para su uso como medicamento para tratar el cáncer según la invención pueden administrarse localmente o sistémicamente. Por ejemplo, sin limitación, los virus oncolíticos según la invención pueden administrarse por vía intravascular (intraarterial o intravenosa), intratumoral, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, oral, parenteral, intranasal, intratraqueal, por vía percutánea, intraespinal, ocular o intracraneal. En realizaciones preferidas, un adenovirus de la invención se administra por vía intravascular o intratumoral.

Los virus oncolíticos competentes en la replicación para su uso como medicamento para tratar el cáncer según la invención también se pueden administrar en un vehículo celular. A este respecto, las células madre neuronales y mesenquimales tienen un alto potencial migratorio, pero permanecen confinadas en el tejido tumoral. Se ha demostrado una subpoblación de células mesenquimales adultas (células infiltrantes tumorales derivadas de médula ósea o BM-TIC), después de la inyección en gliomas, para infiltrarse en todo el tumor. Por consiguiente, los virus oncolíticos de acuerdo con la invención pueden administrarse en un vehículo de células madre neuronales o mesenquimales productoras de virus (por ejemplo, BM-TIC) (por ejemplo, mediante inyección de la célula vehículo en el tumor)

La cantidad a administrar, tanto de acuerdo con el número de tratamientos como con la dosis, depende del sujeto que se va a tratar, el estado del sujeto y la protección deseada. Las cantidades precisas de la composición terapéutica también dependen del juicio del profesional y son propias de cada individuo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, así como las figuras, se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos o figuras representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la divulgación, deberían apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin desviarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1- Construcción y caracterización de Delta-24-RGDOX

El casete de expresión de OX40L de ratón con el promotor de CMV reemplazó a la región E3 del genoma de adenovirus

humano tipo 5. Se eliminó una secuencia de 24 pb dentro de la porción CR2 del gen E1A (correspondiente a los aminoácidos 122-129 en la proteína E1A codificada) responsable de la unión de la proteína Rb. Se inserta una secuencia de codificación del motivo RGD-4C en el bucle HI de proteína de fibra. Véase la Figura 1.

Se evaluó la expresión de OX40L de ratón (mOX40L) por D24-RGDOX en células GL261 (glioma de ratón) y B16 de melanoma de ratón. Las células GL261 o B16 se infectaron con D24-RGDOX a 50 ufp/célula. Después de 48 horas, las células se tiñeron con anticuerpo α -mOX40L (dilución 1:100) (eBioscience, San Diego, CA) y luego con el anticuerpo IG secundario marcado con FITC de cabra anti-rata marcado con FITC (dilución 1:100) (Santa Cruz Biotechnology). La integridad de la membrana celular se controló con tinción con homodímero de etidio-1 (8 μ M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Las células teñidas se analizaron con citometría de flujo. Los números en las esquinas inferiores derechas de las Figuras 2 y 3 indican el porcentaje de células GL261 y B16 de melanoma que expresan mOX40L. D24-RGDOX expresó OX40L eficientemente tanto en células GL261 como en células de melanoma B16.

Se evaluó la expresión de mOX40L en células tumorales GL261-EGFP (GL261 que expresa la proteína fluorescente verde mejorada). Se inyectaron células GL261-EGFP (5×10^4 células) por vía intracraneal en ratones C57BL/6. 12 días después, se inyectó D24-RGDOX por vía intratumoral (5×10^7 ufp). Tres días después de la inyección, los tumores se recogieron y se disociaron con solución de desprendimiento de células ACCUMAX (EMD Millipore, Billerica, MA). Las células se tiñeron después con anticuerpo monoclonal de rata α -mOX40L APC (1:40) (eBioscience). Las células teñidas se analizaron con citometría de flujo. Las células tumorales se acotaron como EGFP positivas. Los números en las esquinas superiores derecha de la Figura 4 indican el porcentaje de células tumorales que expresan mOX40L. Estos datos *in vivo* demuestran la expresión de OX40L en aproximadamente el 9 % de las células de xenoinjerto setenta y dos horas después de la inyección con D24-RGDOX.

Se evaluó la replicación de D24-RGD y D24-RGDOX en U87 MG (línea celular de glioblastoma primario humano con morfología epitelial; Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) o GL261. Las células se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se infectaron con los virus a 10 ufp/célula. Cuarenta y ocho horas después de la infección, la progenie viral infecciosa se tituló utilizando el kit ADENO-X Rapid Titer (Clontech, Mountain View, CA) según las instrucciones de los fabricantes. Los títulos virales finales se determinaron como ufp/ml y se muestran en la Figura 5 como media $\pm$ DE de tres mediciones independientes. La replicación de los dos virus se comparó mediante la prueba T de Students (dos lados). Se demostró que D24-RGDOX se replica tan eficientemente como su virus parental D24-RGD en células de glioma humano U-87 mg mientras que ambos virus se replican muy mal en células GL261. Por consiguiente, los efectos antitumorales descritos en el presente documento con el modelo de glioma de ratón subestiman significativamente los efectos antitumorales esperados del virus (que expresa OX40L) en seres humanos.

Se evaluó la capacidad de D-24-RGD y D24-RGDOX para inducir la secreción de HSP90 y HMGB1. Las células GL261 se infectaron con los virus a 200 ufp/célula. 24 horas después, La concentración del FBS se cambió del 10 % al 2 %. El medio de cultivo (M) y los lisados de células enteras (W) se recogieron en los puntos de tiempo indicados en la Figura 6. El medio de cultivo se concentró 10 veces con concentradores de proteínas (9K MWCO, Thermo Scientific). Luego se analizaron los niveles de expresión de HSP90 y HMGB1 con inmunotransferencia. En resumen, cantidades iguales de proteínas de lisados de células enteras o 40 μ l/medio concentrado en el carril se separaron con electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida con gradiente de 4-20 %, se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa y las membranas se sondaron con anti-HSP90 policlona de conejo y anti-HMGB1 (dilución 1:1000) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-actina policlona de cabra (dilución 1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Los complejos de proteína-anticuerpo se visualizaron usando el sistema de detección de transferencia Western de quimioluminiscencia mejorada (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La actina se usó como control de carga para lisados de células enteras. Los números en la parte inferior de la Figura 6 indican los niveles relativos de HMGB1 secretados al medio. A pesar de la baja eficiencia de replicación del virus en las células GL261, ambos virus indujeron la liberación de ATP y HMGB1, que son el prototipo de moléculas de patrón molecular asociado al daño endógeno (DAMP) que desencadenan la inflamación y la inmunidad durante la muerte celular inmunogénica.

Ejemplo 2 - Efecto terapéutico mejorado inducido por D24-RGDOX

Se evaluó el efecto de D24-RGDOX sobre la supervivencia de un modelo de cáncer de glioma y se comparó con el de D24-RGD y OX86 (agonista de OX40) administrados por separado o juntos. Se inyectaron células GL261 (5×10^4 células) por vía intracraneal en ratones C57BL/6 y ratones atímicos. D24-RGDOX o D24-RGD (5×10^7 ufp) y/o el anticuerpo OX40 de ratón α OX86 (25 μ g, proporcionado por el Monoclonal Antibody Core Facility en MDACC) se inyectaron por vía intratumoral los días 3, 6 y 8 después de la implantación del tumor (los virus se inyectaron tres veces para compensar parcialmente la baja replicación de los virus en las células GL261). Se usó PBS como control negativo. La supervivencia entre los grupos de tratamiento (PBS; D24-RGD; OX86; OX86+D24RGD; D24-RGDOX; $n = 10$ en cada grupo) se comparó utilizando la prueba del rango logarítmico (dos lados). Las Figuras 7A y 7B ilustran las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global de los grupos tratados indicados ($n = 10$ cada grupo) en ratones C57BL/6 o atímicos, respectivamente. Este estudio de supervivencia animal demostró que, mientras que D24-RGD en sí no mostró ningún efecto a la dosis viral de 5×10^7 ufp/ratón para cada inyección ($p = 0,08$), la combinación de D24-RGD con OX86 prolongó significativamente la supervivencia de los ratones (mediana de supervivencia 24 días frente a 17 días, $p = 0,0002$). Es importante destacar que D24-RGDOX extendió aún más la mediana del tiempo de supervivencia

a 28,5 días ($p < 0,0001$) en comparación con D24-RGD. La supervivencia prolongada de los ratones se debe principalmente a la inmunidad anti-glioma provocada por el virus y el anticuerpo porque el beneficio terapéutico no se observó en un modelo de glioma de ratón atómico GL261 inmunodeficiente ($p > 0,3$) (Figura 7B).

La respuesta inmunitaria inducida por D24-RGDOX se examinó y comparó con la de D24-RGD usando análisis de citometría de flujo. Se inyectaron células GL261 (5×10^4 células) por vía intracraneal en ratones C57BL/6. Los virus (5×10^7 ufp) se inyectaron por vía intratumoral los días 6, 8 y 10 después de la implantación del tumor. El día 14, los leucocitos infiltrados en el cerebro (del grupo de 9 ratones) se separaron primero de los restos de mielina con gradiente centrífuga Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) y se utilizaron directamente para el análisis de citometría de flujo. Los anticuerpos usados fueron los siguientes: CD45 anti-ratón APCEFLUOR 780 (dilución 1:200), CD3 anti-ratón FITC (dilución 1:200), CD8a anti-ratón PerCP-Cianina5.5 (dilución 1:80) (eBioscience), CD4 anti-ratón BRILLIANT VIOLET 650 a (dilución 1:100) (BioLegend, San Diego, CA). Los datos se muestran en la Figura 8 como media $\pm$ DE de mediciones por triplicado. Los números de células entre los grupos de tratamiento se compararon mediante la prueba T de Student (dos lados). Los datos demuestran que D24-RGDOX era más eficiente que D24-RGD para inducir linfocitos T (CD45+ CD3+), infiltración de linfocitos T colaboradores (CD45+ CD3+ CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD45+ CD3+ CD8+) en los sitios tumorales ($p < 0,001$).

Se evaluó el efecto de D24-RGDOX sobre la respuesta inmunitaria antitumoral y se comparó con el de D24-RGD. Se inyectaron células GL261 (5×10^4 células) por vía intracraneal en ratones C57BL/6. Los virus (5×10^7 ufp) se inyectaron por vía intratumoral los días 6, 8 y 10 después de la implantación del tumor. El día 14 después de la implantación del tumor, se aislaron esplenocitos de bazo de ratón (grupo de 5 ratones) de cada tratamiento. Para el aislamiento de linfocitos cerebrales (del grupo de 5 hemisferios con tumor), los leucocitos infiltrados en el cerebro se separaron primero de los restos de mielina como se ha descrito anteriormente. Después, los linfocitos cerebrales se aislaron con una centrífuga gradiente en LINFOLITO-M (Cedarlane, Burlington, NC). Para activar los esplenocitos, se incubaron 2×10^4 células diana pre-fijadas con paraformaldehído al 1 % (PFA) con 5×10^5 linfocitos o esplenocitos infiltrados en el cerebro por pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo durante 40 horas. La concentración de IFN γ en el sobrenadante se evaluó con un ensayo ELISA estándar (IFN-gamma DuoSet de ratón, R&D systems). Los datos se muestran en la Figura 9 como media $\pm$ DE de mediciones por triplicado. Las Figuras 10A y 10B ilustran experimentos separados en los que se aislaron linfocitos infiltrados en el cerebro de los ratones de cada grupo de tratamiento el día 21 después de la implantación del tumor y se cocultivaron con MBC como se ha descrito anteriormente (Figura 10A) y en los que se aislaron los esplenocitos de los ratones de cada grupo de tratamiento el día 21 después de la implantación del tumor y se cocultivaron con las células objetivo indicadas como se ha descrito anteriormente (Figura 10B). En cada caso, la concentración de IFN γ en el sobrenadante se midió 40 horas después con el ensayo ELISA estándar (IFN-gamma DuoSet de ratón, R&D systems). Los datos se muestran en las Figuras 10A y 10B como media $\pm$ DE de mediciones por triplicado. La actividad entre los grupos de tratamiento se comparó mediante la prueba T de Student (dos lados). Estos datos demuestran que D24-RGDOX indujo una actividad significativamente más fuerte en las células inmunitarias (esplenocitos y linfocitos infiltrantes del cerebro (BIL)) contra las células tumorales no infectadas o infectadas con virus que D24-RGD o D24-RGD-EGFP ($p, 0,05$). Las células tumorales infectadas con D24-RGDOX desencadenaron una actividad más fuerte en los BIL que las células tumorales infectadas con D24-RGD ($p < 0,002$), lo que indica que la expresión de OX40L por D24-RGDOX aumentó la capacidad de las células tumorales para estimular las células inmunitarias. Aunque D24-RGDOX causó una reacción inmunitaria más fuerte contra el cultivo primario de células cerebrales de ratón (MBC) que otros grupos en los BIL ($p = 0,01$), aún induce una actividad significativamente mayor contra las células tumorales que contra las MBC ($p > 0,005$). Sin embargo, esta reacción aumentada de BIL inducida por D24-RGDOX contra MBC (15,6 veces de D24-RGD) fue aguda ya que se rechazó después de otros siete días (1,6 veces de D24-RGD). El nivel agudo de actividad de BIL contra MBC inducido por D24-RGDOX se redujo aproximadamente cuatro veces después de siete días. Además, la reacción aumentada contra MBC inducida por D24-RGDOX no se observó en los esplenocitos ($p = 0,2$) mientras que el aumento de la reacción contra las células tumorales se mantuvo después de otros siete días en los esplenocitos. La diferencia de actividad entre el grupo tratado con D24-RGDOX y los otros grupos en los esplenocitos fue incluso mayor que los siete días anteriores.

Los presentes inventores, por primera vez, han combinado el adenovirus oncolítico D24-RGD con el objetivo de la vía coestimuladora tardía OX40L/OX40 para tratar gliomas en un modelo de ratón inmunocompetente. D24-RGDOX muestra una capacidad superior para provocar inmunidad anti-glioma que su virus parental D24-RGD. Debido a la naturaleza selectiva del cáncer de D24-RGD, OX40L debe expresarse preferentemente en células cancerosas. Además, a diferencia de los ligandos para CD28 que también se unen a CTLA4, El ligando OX40 se une selectivamente a OX40. Por consiguiente, OX40L estimula a OX40 en linfocitos T con TCR que reconoce antígenos virales asociados a tumores, dando como resultado la expansión de las poblaciones de linfocitos T específicos de tumor. Por consiguiente, diferente del anticuerpo agonista de OX40, los anticuerpos antagonistas para CTLA-4 y PD-1 o el uso de virus oncolíticos para expresar moduladores inmunes para activar globalmente las células inmunitarias, la modulación de los linfocitos T por OX40L expresada por D24-RGDOX está más limitada a los linfocitos T específicos de tumor. Por tanto, D24-RGDOX tiene menos probabilidades de causar toxicidad sistémica relacionada con esas terapias. Según las presentes ejemplificaciones, se espera que el porcentaje de pacientes con cáncer humano con una respuesta completa aumente significativamente con D24-RGDOX. También se espera que la duración de la respuesta clínica aumente con D24-RGDOX debido a la memoria inmune mejorada estimulada por la vía OX40L/OX40.

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico competente en la replicación que comprende un ácido nucleico heterólogo insertado en una región no esencial del genoma de adenovirus, comprendiendo dicho ácido nucleico una secuencia que codifica un agonista de OX40 (CD134) unido operativamente a un elemento de control transcripcional, en el que el agonista de OX40 (CD134) es el ligando OX40 (OX40L) (gp34), preferentemente en el que el ácido nucleico que codifica OX40L codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en el Número de Acceso GenBank NP_003317.1 o una secuencia al menos un 95 % idéntica a la misma y, más preferentemente, en el que el ácido nucleico que codifica OX40L tiene la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de referencia NCBI: NM_003326.3 o una secuencia al menos un 95 % idéntica a la misma, o es un anticuerpo contra OX40.
2. Un virus oncolítico competente en la replicación de la reivindicación 1, en el que el virus oncolítico competente en la replicación es un adenovirus oncolítico competente en la replicación.
3. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación de la reivindicación 2, en el que el adenovirus comprende una delección en parte o la totalidad de la región del gen E3, preferentemente en el que dicho ácido nucleico heterólogo se inserta en la región del gen con delección E3 del adenovirus.
4. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación de cualquier reivindicación precedente, 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, preferentemente en el que el adenovirus es Delta-24 o Delta-24-RGD.
5. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el adenovirus se selecciona de ICOVIR-5, ICOVIR-7, ONYX-015, ColoAd1, H101 y AD5/3-D24-GMCSF.
6. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el genoma del adenovirus comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogo que codifican un antígeno tumoral, por el cual el adenovirus expresa el o los antígenos tumorales en su superficie, preferentemente en el que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en: MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, tirosinasa, midkina, 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, IL13Ralpha, IL13Ralpha2, AIM-2, AIM-3, NY-ESO-1, C9orf12, SART1, SART2, SART3, BRAP, RTN4, GLEA2, TNKS2, KIAA0376, ING4, HSPH1, C13orf24, RBPSUH, C6orf53, NKTR, NSEP1, U2AF1L, CYNL2, TPR, SOX2, GOLGA, BMI1, COX-2, EGFRvIII, EZH2, LICAM, Livina, Livina, MRP-3, nestina, OLIG2, ART1, ART4, B-ciclina, Gli1, Cav-1, cathepsina B, CD74, E-cadherina, EphA2/Eck, Fra-1/Fosl1, 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 inmunogénico de los mismos.
7. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación de la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico heterólogo se inserta en la región hipervariable 5 del gen hexon del adenovirus o se inserta en la región del bucle HI del gen de la fibra del adenovirus, preferentemente en el que el adenovirus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica EGFRvIII o un péptido inmunogénico del mismo insertado en la región del bucle HI del gen de la fibra del adenovirus y/o un ácido nucleico heterólogo que codifica NY-ESO-1 o un péptido inmunogénico del mismo insertado en la región hipervariable 5 del gen hexón del adenovirus.
8. Una composición farmacéutica que comprende un adenovirus oncolítico competente en la replicación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente que comprende además uno o más agentes estimulantes de Th1 seleccionados del grupo que consiste en: IL-12p70, IL-2, IFN- γ , lenalidomida, temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida), ciclofosfamida ((RS)-N,N-bis(2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina 2-óxido), lomustina (CCNU; N-(2-cloroetil)-N-ciclohexil-N-nitrosourea), bis-cloroetilnitrosourea (BCNU), clorhidrato de melfalán (4[bis(cloroetil)amino]fenilalanina), busulfán(butano-1,4-diildimetanosulfonato), mecloretamina (mostaza nitrogenada), clorambucilo, ifosfamida, estreptozocina, dacarbazina (DTIC), tiotepa, altretamina (hexametilmelamina), cisplatino, carboplatino, oxalapatino, ipilimumab, tremelimumab, MDX-1106, MK-3475, AMP-224, pidilizumab y MDX-1105.
9. Una composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que el agente estimulante Th1 es IFN- γ o temozolomida.
10. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 para su uso como medicamento para tratar el cáncer.
11. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación o una composición para su uso como medicamento para tratar el cáncer de acuerdo con la reivindicación 10, en el que:
 - a) el paciente tiene un cáncer seleccionado de cáncer cerebral primario o metastásico, melanoma, adenocarcinoma, tioma, linfoma, sarcoma, cáncer broncopulmonar, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga, cáncer de riñón y cáncer de páncreas, preferentemente en el que el paciente tiene un glioma de bajo o alto nivel,
 - b) el adenovirus se administra por vía intratumoral, intravascular o en un vehículo de células madre neuronales o

mesenquimales, preferentemente en el que el adenovirus se administra por vía intratumoral,

c) el adenovirus se administra una o varias veces a una dosis de 10^8 - 10^{13} unidades formadoras de placas (ufp),

d) que comprende la inyección de una cantidad efectiva del adenovirus en la masa o vasculatura del tumor, preferentemente por el cual el crecimiento tumoral se reduce tanto en el tumor inyectado como en al menos un tumor no inyectado,

e) el paciente exhibe una relación IL-12 a IL-4 inferior a 20, y/o

f) el paciente es un ser humano.

12. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición de acuerdo con la reivindicación 8 combinada con un agente estimulante de Th1 para su uso como medicamento para tratar el cáncer, en el que el agente estimulante de Th1 se selecciona del grupo que consiste en: IL-12p70, IL-2, IFN- γ , lenalidomida, temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0]nona-2,7,9-trieno-9-carboxamida), ciclofosfamida ((RS)-N, N-bis (2-cloroetil)-1,3,2-oxazafosfinan-2-amina 2-óxido), lomustina (CCNU; N-(2-cloroetil)-N-ciclohexil-N-nitrosourea), bis-cloroetilnitrosourea (BCNU), clorhidrato de melfalán (4[bis(cloroetil)amino]fenilalanina), busulfán (butano-1,4-diil-dimetanosulfonato), mecloretamina (mostaza nitrogenada), clorambucilo, ifosfamida, estreptozocina, dacarbazina (DTIC), tiotepa, altretamina (hexametilmelamina), cisplatino, carboplatino, oxalapatino, ipilimumab, tremelimumab, MDX-1106, MK-3475, AMP-224, pidilizumab y MDX-1105, preferentemente en la que el agente estimulante de Th1 es IFN- γ o temozolomida.

13. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación o una composición combinada con un agente estimulante de Th1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el agente estimulante de Th1 se administra antes del adenovirus oncolítico competente en la replicación y/o en el que el adenovirus es Delta-24 o Delta-24-RGD y el agonista de OX40 es el ligando OX40 (OX40L) (gp34).

14. Un adenovirus oncolítico competente en la replicación o una composición combinada con un agente estimulante Th1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en el que el paciente es un ser humano.

FIGURA 1

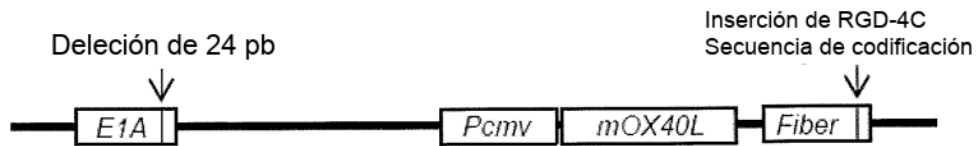


FIGURA 2

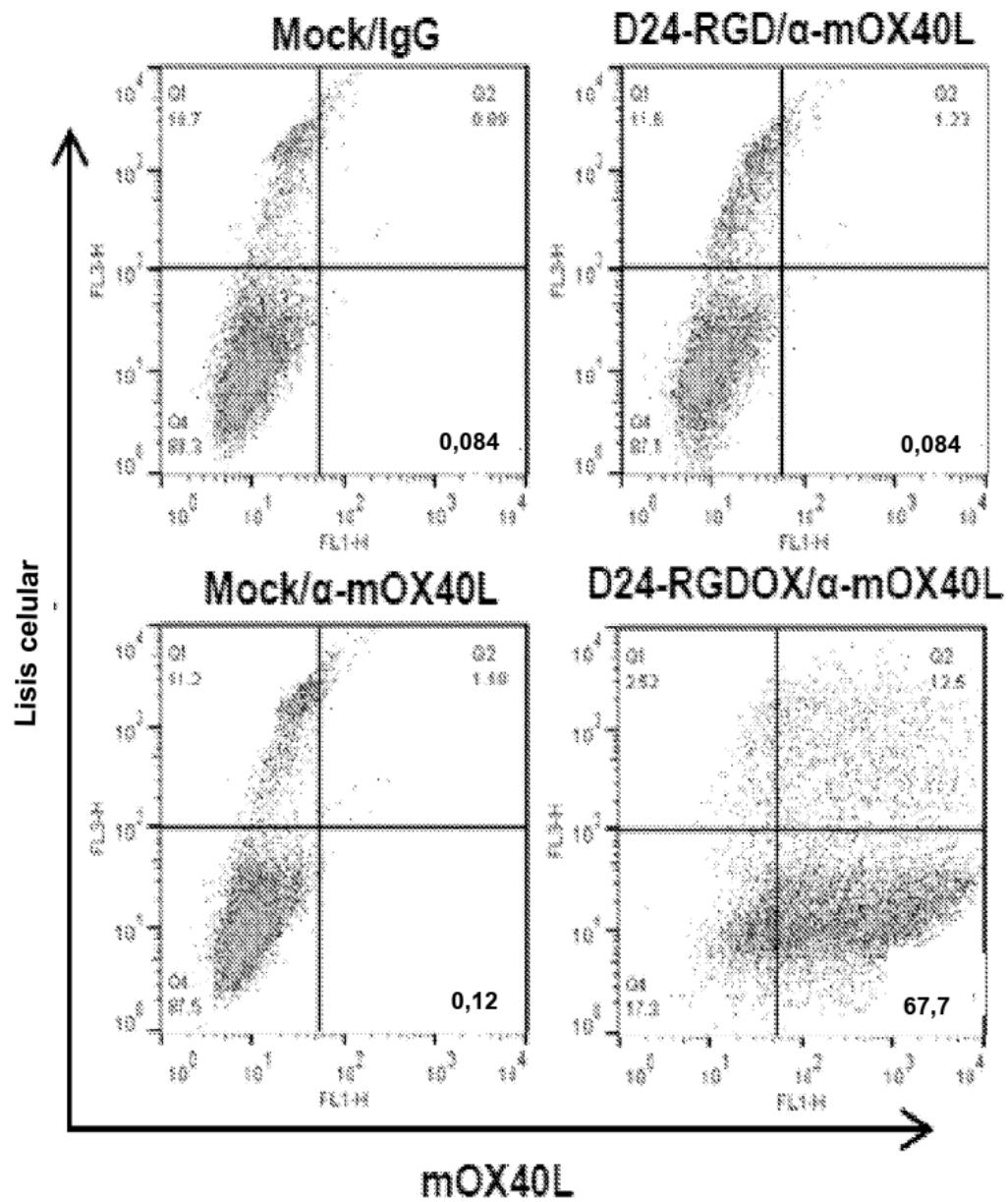


FIGURA 3

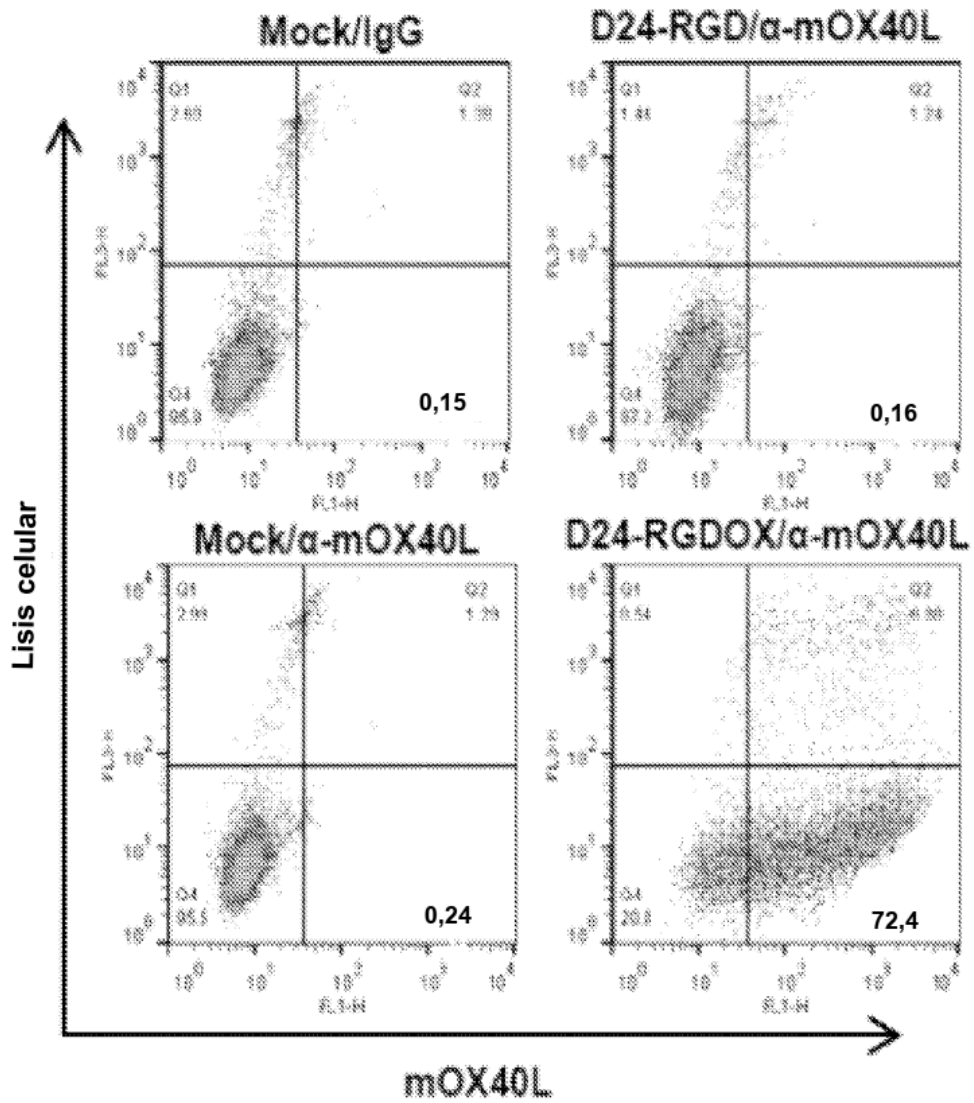


FIGURA 4

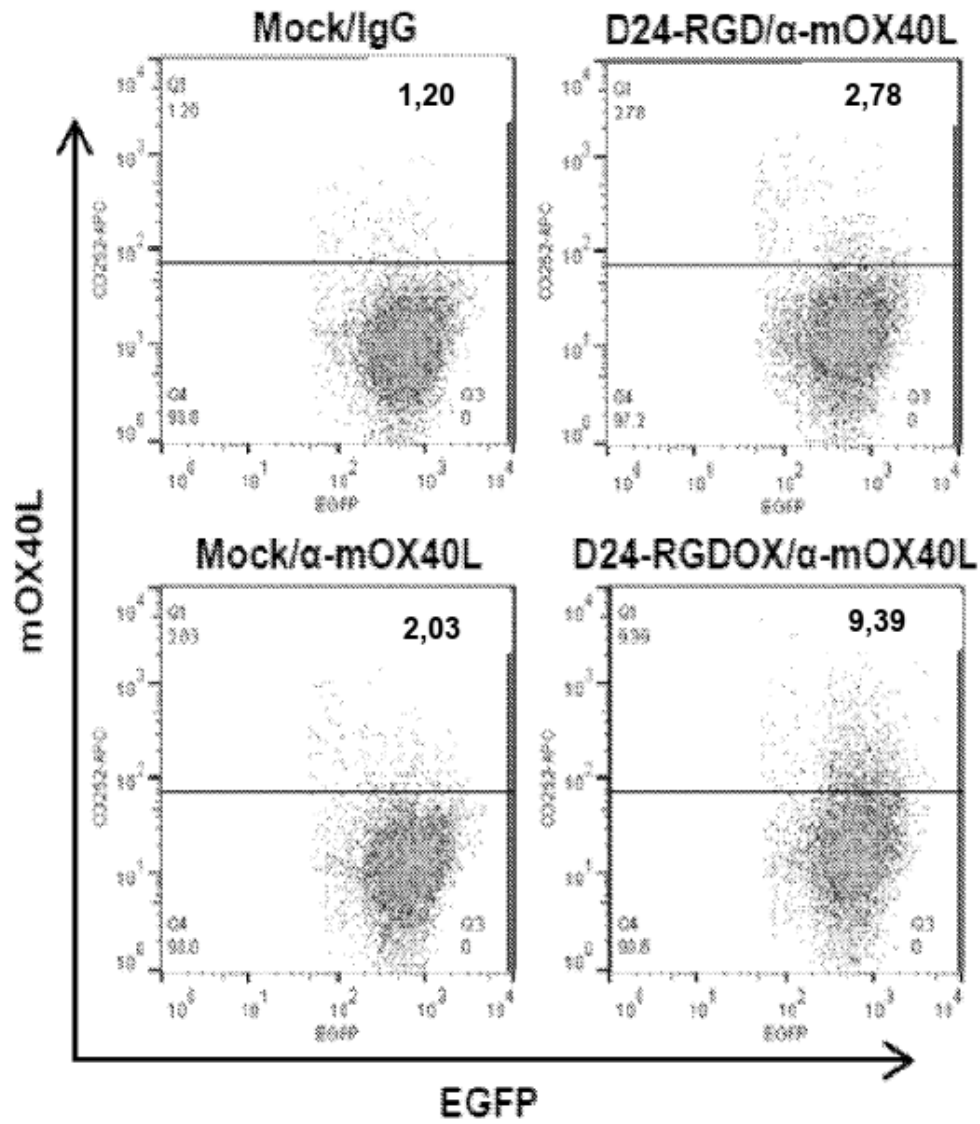


FIGURA 5

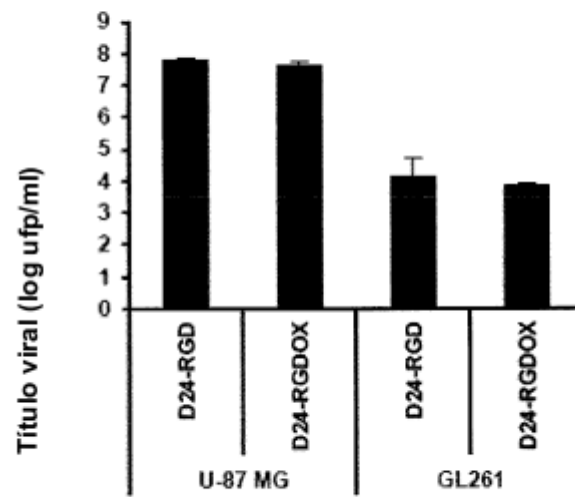


FIGURA 6

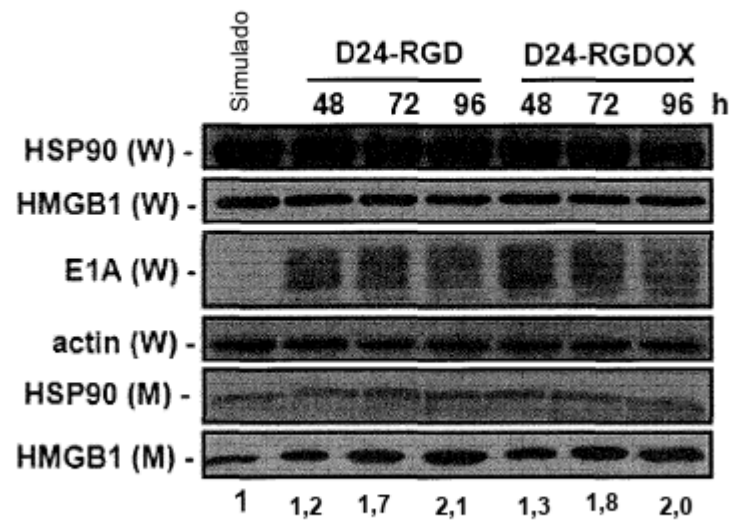


FIGURA 7A-C

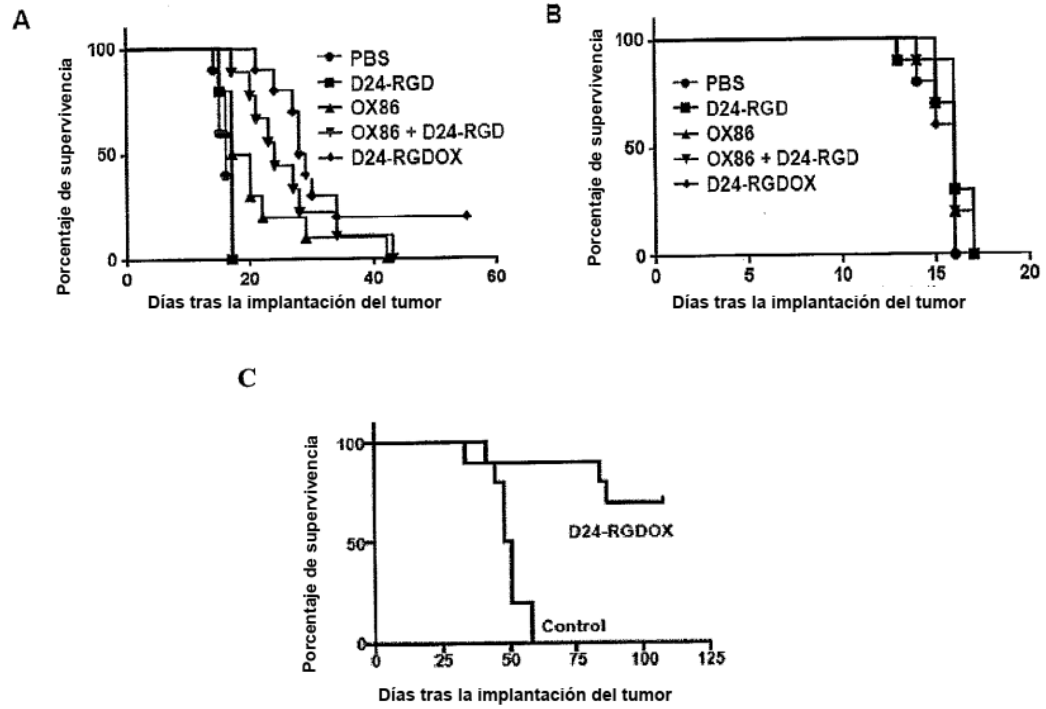
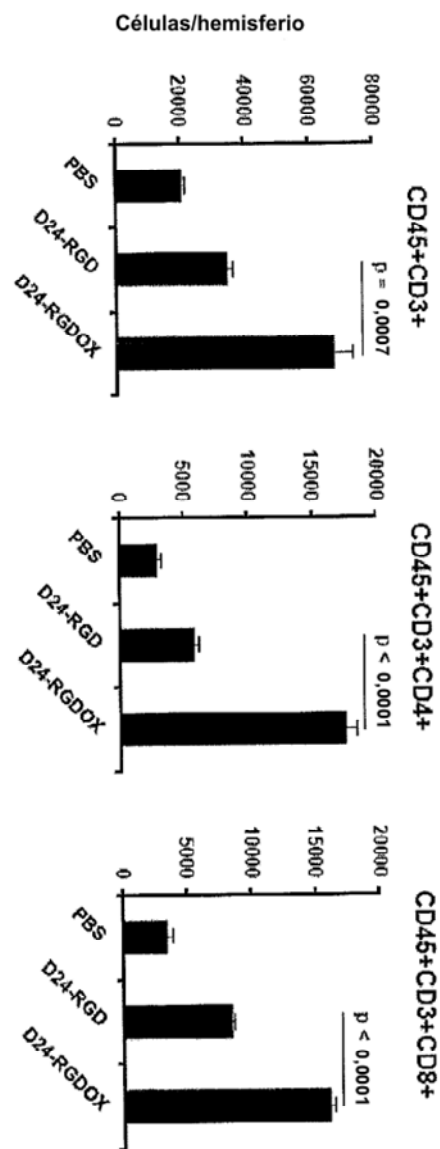


FIGURA 8



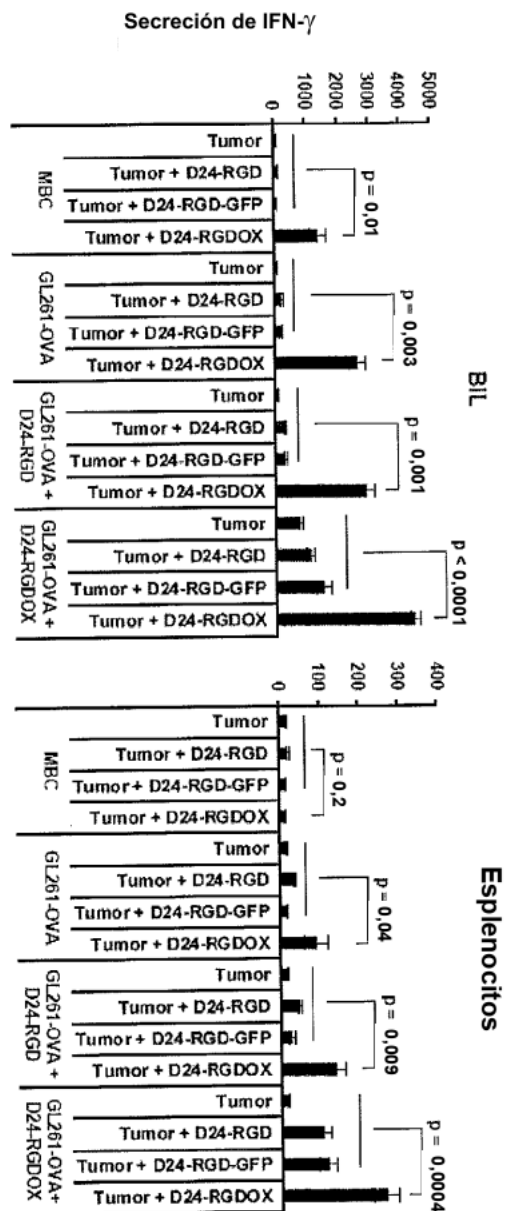
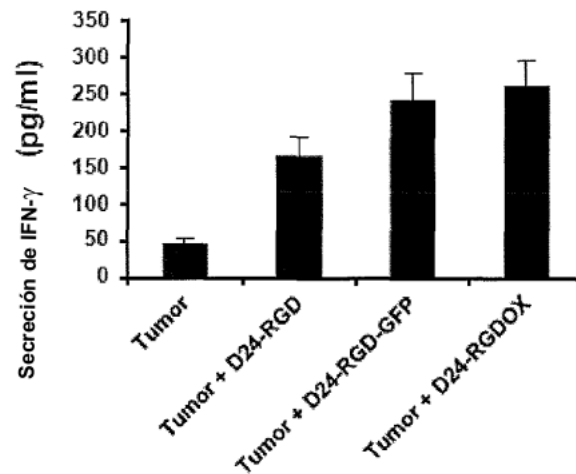


FIGURA 9

FIGURA 10A y 10B

A



B

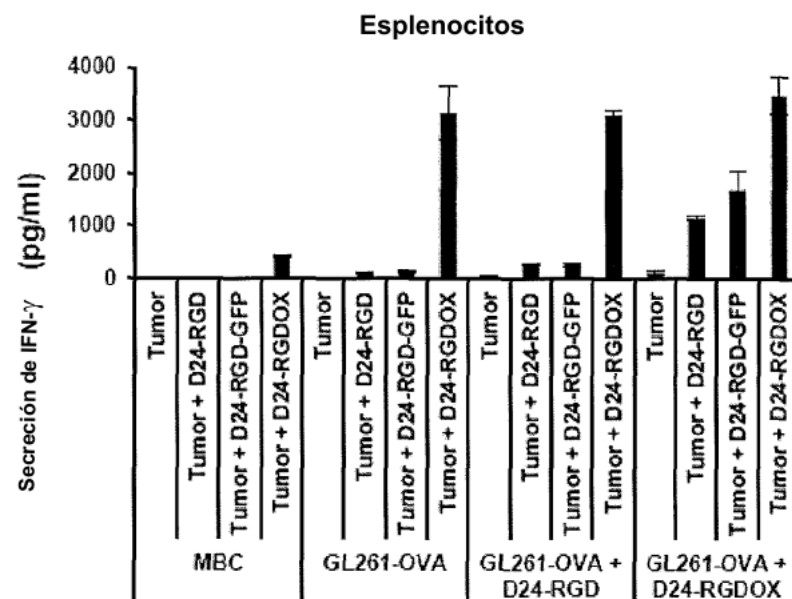


FIGURA 11

B

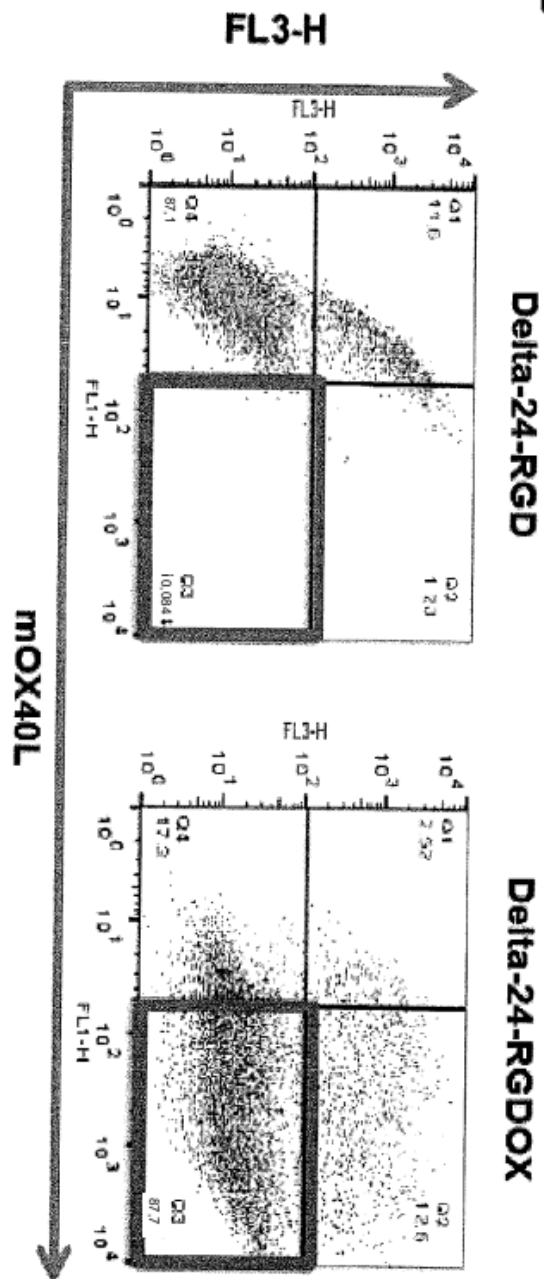
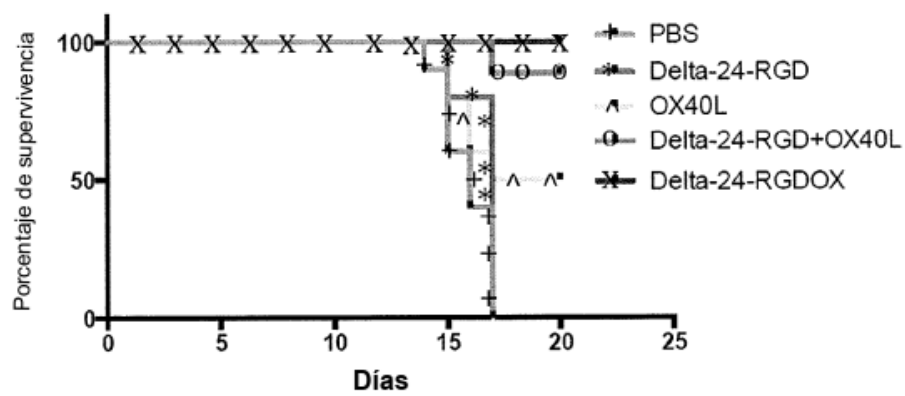


FIGURA 12



γ

FIGURA 13

