

ADENOVIRUS ONCOLÍTICO QUE CODIFICA UNA PROTEÍNA B7**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente descripción se refiere a un adenovirus
5 oncolítico que comprende un transgen que codifica al menos
una proteína B7 tal como una CD80 o un fragmento activo de la
misma, composiciones que comprenden la misma y uso del virus
y composiciones en el tratamiento, particularmente en el
tratamiento de cáncer.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer es todavía una gran carga social para la
sociedad en términos de la privación y sufrimiento de
pacientes y sus seres queridos, y también en términos de los
altos costos financieros de tratar, cuidado y dar apoyo a los
15 pacientes. Se cree ahora que el sistema inmune de individuos
sanos limpia las células cancerosas rutinariamente. Sin
embargo, en aquellos pacientes con cáncer uno o más de los
mecanismos de defensa involucrados en apagados completamente.

Se sabe ahora que los tumores cambian su
20 microambiente para hacerlos más permisivos a su crecimiento.
Esto ocurre por las señales extracelulares que liberan el
tumor que, por ejemplo, promueven la angiogénesis del tumor
y/o inducen supresión inmune o tolerancia inmune local.

Es claro a partir de muchos diferentes estudios
25 clínicos y preclínicos que el microambiente dentro de los

tumores puede suprimir el desarrollo y actividad de respuestas inmune anti-tumorales, con una amplia variedad de mecanismos siendo mostrados por jugar potencialmente un papel. En particular, los mecanismos inmuno-supresores finalmente previenen las respuestas de las células T de mediar la eliminación de células tumorales. Los mecanismos supresores pueden incluir la exclusión de células T de entrar a los tejidos tumorales, inhibir la activación de células T que entran al tumor y la modulación de proteínas de células tumorales las cuales reducen la capacidad de las células T para reconocer o responder a ellas. La importancia de tales trayectorias inmunosupresoras en soportar el progreso del tumor ha sido particularmente destacada por la eficacia clínica mostrada por los anticuerpos a receptores en dos de tales trayectorias supresoras, CTLA4 y PD-1/PDL1, las cuales han conducido a su comercialización aprobada para el tratamiento del melanoma y otros cánceres.

La B7 es un tipo de proteína de la membrana periférica encontrada en células que presentan antígeno activado (APC) que, cuando se aparea con ya sea una proteína de la superficie CD28 o CD152 (CTLA-4) en una célula T, puede producir una señal co-estimuladora o una señal co-inhibidora para mejorar o disminuir la actividad de la señal MHC-TCR entre las células que presentan antígeno (APC) y las células T, respectivamente. Además de estar presentes en APCs

activadas, las B7 también se pueden encontrar en las células T mismas.

Existen varias etapas para la activación del sistema inmune contra un antígeno. El receptor de células T debe primero, interactuar con un complejo de su antígeno peptídico específico (Ag) unido a una proteína de la superficie del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). Las proteínas CD4 o CD8 en la superficie de células T interactúan con la MHC para ayudar a estabilizar la interacción MHC/Ag con el complejo receptor de células T, el cual comprende tanto los dímeros de cadena de unión al antígeno (alfa/beta o gamma/delta) como el complejo de señalización de CD3 (que comprende cadenas gamma, delta, épsilon y zeta). También es referido como "Señal 1" y su propósito principal es proporcionar la señalización inicial y garantizar la especificidad del antígeno de la activación de células T.

Sin embargo, la unión de MHC es insuficiente por sí misma para estimular la diferenciación y activación de células T efectoras completas. En efecto, la carencia de señales estimuladoras adicionales puede proporcionar las células T anérgicas. Las señales co-estimuladoras necesarias para continuar la respuesta inmune pueden venir de las interacciones de B7-CD28 y CD40-CD40L. Existen otras señales de activación las cuales juegan un papel en las respuestas

inmune. Por ejemplo, en la familia de moléculas del TNF, la proteína 4-1BB (CD137) en la célula T puede unirse a 4-1BBL en la APC.

La proteína B7 (CD80/B7-1 y/o CD86/B7-2) está
5 presente en la superficie de APC, e interactúa con el receptor CD28 en la superficie de las células T. Esta es una fuente de "Señal 2" (las citocinas también pueden contribuir a la activación de células T, lo cual también puede ser referido como "Señal 3"). Esta interacción produce una serie
10 de señales corriente abajo las cuales promueven la supervivencia, activación y diferenciación de células T objetivo en una célula efectora que puede mediar aspectos de la respuesta inmune, tal como eliminación de células infectadas con virus o células tumorales, y el reclutamiento
15 de células inflamatorias.

Usualmente para iniciar una respuesta de células T, la señal estimuladora y la señal coestimuladora son proporcionadas por una célula que presenta antígeno con el fin de inducir tanto respuestas de células T CD4 como CD8.
20 Pero las células T CD8 efectoras reconocen su Ag asociado con las moléculas de MHC clase I las cuales están presentes en la mayoría de células nucleadas, que incluyen células tumorales. Sin embargo, los presentes inventores tienen razón para creer que las señales para activar las células T no necesitan venir
25 de la misma célula o tipo de célula. Por lo tanto, podría ser

útil proporcionar una o más de estas señales (es decir, la señal estimuladora y/o la señal co-estimuladora) al sistema inmune, por ejemplo, en la superficie de una célula cancerosa.

5 Actualmente existe mucho interés en la inhibición de la actividad de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) y/o su ligando PDL1 (también conocido como B7-H1) debido a que esta trayectoria se piensa juega un papel importante en la respuesta inmune de regulación descendente,
10 por ejemplo, en cánceres.

 Sin embargo, algunos trabajos hechos sugieren que CD80 (B7-1) no solamente actúa como un co-estimulador de células T por unión a CD28 en la célula T, sino también puede unirse a PDL1, por ejemplo, cuando se expresa en la misma
15 membrana celular, y bloquea las interacciones de señalización inhibidora de PDL1-PD1. De este modo, actuando en dos diferentes formas, las CD80 pueden ser una molécula viable y potencialmente más útil para restaurar o mejorar la activación de células T humanas. Las formas solubles de CD80
20 también parecen ser capaces de contrarrestar la inhibición de células T mediadas por PDL1-PD1, véase, por ejemplo, Haile *et al.*, Soluble CD80 Restores T Cell Activation and Overcomes Tumor Cell Programmed Death Ligand 1-Mediated Immune Suppression J Immunol 2013; 191:2829-2836. Una proteína de
25 fusión CD80-Fc ha sido generado y está siendo probada por

seguridad y eficacia, véase the Journal of Immunology, 2014, 193: 3835-3841.

Los presentes inventores creen que las proteínas B7 o un fragmento activo de la misma suministradas y expresadas por un virus oncolítico, por ejemplo, en la superficie de una célula cancerosa, podrían ser útiles en la activación del sistema inmune propio del paciente para luchar contra el cáncer.

Además, las proteínas B7, tales como CD80, si se administran simplemente, tienen sistémicamente el potencial para estimular respuestas inmunes sistémicamente en una forma indeseable. Los presentes inventores creen que un suministro más sofisticado de estas proteínas se requieren para crear una ventana terapéutica adecuada donde los efectos terapéuticos benéficos son realizados y los efectos fuera de objetivo son minimizados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

De este modo, se proporciona un adenovirus oncolítico con selectividad para células cancerosas, en donde el adenovirus comprende un transgen bajo el control de un promotor endógeno al virus, en donde el transgen comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína B7 o un fragmento activo de la misma. Esto es benéfico debido a que los virus oncolíticos de conformidad con la presente descripción infectan preferiblemente células cancerosas y de

este modo, penetran el microambiente creado por el cáncer. Una vez en las células cancerosas las proteínas B7 codificadas por el virus pueden ser expresadas, por ejemplo, en la superficie celular (es decir, superficie de la célula cancerosa). Esto es ventajoso debido a que la proteína B7
5 está entonces en la ubicación deseada donde puede ser activa biológicamente.

En una modalidad la proteína B7 codificada comprende una secuencia capaz de anclar la proteína en la
10 superficie de una célula, por ejemplo, un dominio de la secuencia de la transmembrana, anclaje GPI o similares.

De este modo, en una modalidad la célula cancerosa es infectada con un virus de la presente descripción el cual expresa una proteína o molécula B7, en particular en la
15 superficie de la célula cancerosa, en donde la proteína B7 es adecuada para proporcionar al menos la señal coestimuladora, es decir, la señal 2 para activar una célula T, y/o puede unirse a, e inhibir la actividad de PD-L1 expresado en la superficie de la célula cancerosa u otras células en el
20 microambiente local.

En una modalidad la secuencia B7 comprende un elemento de la transmembrana a partir de una proteína B7, por ejemplo, un elemento de la transmembrana nativo a la proteína B7 particular o un dominio de la transmembrana a partir de
25 una proteína B7 "diferente" a aquella que es particularmente

expresada.

Las proteínas B7 son proteínas expresadas en la superficie y también pueden ser empleadas para llevar proteínas adicionales a la superficie de la célula cancerosa, por ejemplo, donde al menos el dominio de la transmembrana de una proteína B7 está unida a una proteína adicional.

De este modo, en un aspecto se proporciona un adenovirus oncolítico de replicación competente con selectividad para células cancerosas, en donde el adenovirus comprende un transgen bajo el control de un promotor endógeno al virus, en donde el transgen comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína B7 o un fragmento activo de la misma.

También se proporciona un virus oncolítico de replicación competente de conformidad con la reivindicación 1, en donde la proteína B7 o fragmento activo de la misma se selecciona independientemente a partir del grupo que comprende B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5 y B7-H6, en particular en donde la proteína B7 es B7-1 (CD80) o un fragmento activo de la misma.

En una modalidad el virus oncolítico de replicación competente es un adenovirus del grupo B.

En una modalidad el virus oncolítico de replicación competente es un virus quimérico.

En una modalidad el virus oncolítico de replicación

competente tiene un esqueleto que es enadenotucirev (también referido como EnAd).

En una modalidad el virus oncolítico de replicación competente tiene a formula (I):

5 5'ITR-B1-BA-B2-BX-BB-BY-B3-3'ITR (I)

B₁ comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

B_A es E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ es un enlace o comprende E3 o un transgen, por ejemplo, bajo un promotor endógeno o exógeno;

10 B_X es un enlace o una secuencia de ADN que comprende: un sitio de restricción, uno o más transgenes o ambos;

B_B comprende L5;

B_Y comprende un transgen que codifica una proteína

15 B₇ o un fragmento activo de la misma; y

B₃ es un enlace o comprende E4.

En una modalidad el virus oncolítico de replicación competente de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la proteína B₇ o fragmento
20 activo de la misma comprende una secuencia de la transmembrana, por ejemplo, un dominio de la transmembrana a partir de un receptor PDGF, un anclaje de GPI adecuado para anclar la proteína o fragmento en una membrana celular.

En una modalidad el virus oncolítico de replicación
25 competente comprende además un segundo transgen, por ejemplo,

que codifica un polipéptido seleccionado a partir del grupo que comprende una citocina, una quimiocina, una molécula de anticuerpo antagonista o fragmento de la misma, y una molécula de anticuerpo antagonista o fragmento de la misma.

5 En una modalidad el segundo y tercer transgen, por ejemplo, que codifica dos polipéptidos diferentes seleccionados a partir del grupo que comprende una citocina, una quimiocina, un anticuerpo, tal como una molécula de anticuerpo antagonista o fragmento de la misma, o una
10 molécula de anticuerpo agonista o fragmento de la misma.

En una modalidad el segundo o tercer transgen codifica una citocina, seleccionada a partir del grupo que comprende IL-2, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, ligando Flt3, GM-CSF, IL-15, y IL-12.

15 En una modalidad el segundo o tercer transgen codifica una quimiocina, seleccionada a partir del grupo que comprende MIP1 α , IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 y CCL21.

20 En una modalidad una combinación de citocina y quimiocina es codificada por el virus seleccionado a partir del grupo que comprende Mip1 α y ligando Flt3, y MIP1 α e IFN α .

En una modalidad el virus codifica una molécula de anticuerpo o fragmento de la misma, por ejemplo, que comprende una secuencia de la transmembrana o anclaje de GPI
25 de manera que es una forma anclada a la membrana celular o un

dominio de la transmembrana, por ejemplo, a partir de un receptor PDGF.

En una modalidad la molécula de anticuerpo o fragmento de unión de la misma comprende un dominio de unión
5 al antígeno CD3 anti-humano.

En una modalidad la molécula de anticuerpo es un inhibidor, por ejemplo, seleccionado a partir del grupo que comprende un inhibidor de un factor de angiogénesis, tal como una molécula de anticuerpo anti-VEGF, e inhibidor de factores
10 de desactivación de células T, tal como una molécula de anticuerpo anti-CTLA-4.

En una modalidad la molécula de anticuerpo es un agonista, por ejemplo, de uno o más seleccionados a partir del grupo que comprende CD40, GITR, OX40, CD27 y 4-1BB.

15 En una modalidad una proteína o proteínas exógenas codificadas por el virus es/son una forma adecuada para expresión en una superficie de la célula cancerosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra algunas de las moléculas clave
20 involucradas en el reconocimiento de las células T de células que presentan antígeno o células tumorales, y algunos de los eventos de señalización inducidos en las células T que responden. La estructura de PDL1 e interacción con el dominio IgV de PD1 también es ilustrado.

25 La Figura 2 muestra algunos de los ligandos de la

familia B7 y patrones de unión a partir de la familia CD28 de receptores.

La Figura 3 muestra esquemáticos de los casetes de transgen para virus que expresan CD80 humano (Figura 3A), co-
5 expresan IFN α humano y CD8 humano (Figura 3B), co-expresan OKT3 scFv y CD80 humano (Figura 3C), co-expresan Flt3L humano, MIP1 α humano e IFN α humano (Figura 3D), co-expresan Flt3L humano, MIP1 α humano y CD80 humano (Figura 3E), co-
expresan human IFN α , MIP1 α humano y CD80 humano (Figura 3F),
10 y un esquemático del marco lector abierto (ORF) o el OKT3 scFv (Figura 3G).

La Figura 4 muestra replicación de EnAd (ColoAd1) y CD80 humano que codifica el virus NG-330 en células tumorales HT-29 (Figura 4A) y A549 (Figura 4B).

15 La Figura 5 muestra la expresión de CD80 en la membrana de células tumorales A549 (Figura 5A) o HT-29 (Figura 5B) por inmunoteñido fluorescente en diferentes tiempos después de la infección con NG-330. No se observó expresión de CD80 en la membrana celular con EnAd o células
20 tumorales no infectadas (UIC).

La Figura 6 muestra potencias oncolíticas comparables de EnAd y NG-330 en un ensayo de citotoxicidad de HT-29. De este modo, NG-330 retiene sus propiedades oncolíticas mientras también porta un transgen.

25 La Figura 7 muestra la potencia oncolítica

comparable de EnAd y el CD80 + $\text{IFN}\alpha$ que expresa el virus NG-343 (Figura 7 A) y secreción de $\text{IFN}\alpha$ por células tumorales HT-29 y A549 infectadas con NG-343 durante un periodo de hasta 72 horas.

5 La Figura 8 muestra la expresión de CD80 y eliminación de células tumorales a 48 o 72 horas post-infección por análisis de FACS usando inmunoteñido anti-CD8 junto con una cepa de viabilidad celular. El CD80 podría ser detectado en la superficie celular de tanto células tratadas
10 con NG-343 vivas como muertas, pero no células tumorales A549 de control no infectadas (UIC) o EnAd (Figura 8A-D). La expresión de CD80 similar se vio con células tumorales A549 como HT-29 (Figura 8E).

La Figura 9 muestra la replicación comparable del
15 virus con tanto EnAd como NG-343 en células tumorales (HT-29) y sin tumor (MRC5, WI38 y células epiteliales bronquiales), con las últimas que muestran niveles de replicación muy inferiores (Figura 9A), secreción de $\text{IFN}\alpha$ (Figura 9B) y expresión de CD80 (Figura 9C) después de la infección de NG-
20 343 solamente detectada en células tumorales HT-29.

La Figura 10 muestra que las células tumorales A549 infectadas con NG-343 pueden inducir los niveles de superficie incrementada de tanto CD80 como PD-L1 en la superficie de DCs en co-cultivos de PBMC cuando se compara
25 con cultivo celular de tumor no infectado o infectado con

EnA.

La Figura 11 muestra la expresión de $IFN\alpha$ y CD80 por células tumorales HT-29 (Figura 11A y C) y A549 (Figura 11B y C) infectadas con el virus NG-347.

5 La Figura 12 muestra la expresión de $MIP1\alpha$ (Figura 12A), $IFN\alpha$ (Figura 12B) y Flt3L (Figura 12C) por células tumorales A549 infectadas con el virus NG-345.

La Figura 13 muestra la potencia oncolítica comparable (Figuras 13A y B) e infectividad (Figura 13C) de
10 virus EnAd, NG-347 y NG-348 en un ensayo de citotoxicidad de HT-29.

La Figura 14 muestra la alta expresión de CD80 por 48 horas en la superficie celular de células tumorales A549 infectadas con ya sea virus NG-347 o NG-348 pero poca o
15 ninguna expresión de CD80 después de la infección con EnAd.

La Figura 15 muestra la alta expresión de CD80 por 48 horas en la superficie celular de células tumorales DLD-1 infectadas con ya sea virus NG-347 o NG-348 pero poca o ninguna expresión de CD80 después de la infección con EnAd.

20 La Figura 16 muestra la expresión de CD80 en células EpCam⁺ A549 infectadas con NG-348 y co-cultivadas con células T CD3⁺ humanas, pero no cuando la infección fue con EnAd.

La Figura 17 muestra que la CD25 es regulada
25 ascendentemente en células T CD3⁺ humanas después del co-

cultivo con células A549 infectadas con NG-349, pero no cuando la infección fue con EnAd (Figura 17A), con tanto el porcentaje de células CD25⁺ (Figura 17B) como el nivel de expresión de CD25 por célula (Figura 17C) fue incrementado.

5 La Figura 18 muestra que la CD25 es regulada ascendentemente en tanto subseries de células T CD3⁺ humanas CD4⁺ y CD4⁻ (principalmente CD8) después del co-cultivo con células A549 infectadas con NG-348, pero no cuando la infección fue con EnAd.

10 La Figura 19 muestra el bajo nivel de expresión de HLA-DR en células T CD3⁺ humanas después del co-cultivo con células A549 infectadas con EnAd o NG-348.

 La Figura 20 muestra inducción de la expresión CD107a en la superficie de células T CD3⁺ vivas después del
15 co-cultivo con células A549 infectadas con NG-348, pero no cuando la infección fue con EnAd.

 La Figura 21 muestra inducción de la expresión de CD107a en la superficie de tanto subseries de células T CD3⁺ CD4⁺ como CD4⁻ después del co-cultivo con células A549
20 infectadas con NG-348, pero no cuando la infección fue con EnAd.

 La Figura 22 muestra inducción de la producción de IL-2 (Figura 22A) e IFN γ (Figura 22B) por células T CD3⁺ después del co-cultivo con células A549 infectadas con NG-
25 348, pero no IL-2 y solamente niveles bajos de IFN γ cuando la

infección fue con EnAd.

La Figura 23 muestra inducción de la producción de IFN γ por tanto células T CD3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ (Figura 22B) después del co-cultivo con células A549 infectadas con NG-348, pero
5 no IFN γ (células CD4 $^{+}$) o bajo (células CD8 $^{+}$) cuando la infección fue con EnAd.

La Figura 24 muestra que la CD69 es regulada ascendentemente en células T CD3 $^{+}$ más humanas después del co-cultivo con células A549 infectadas con NG-347 que cuando la
10 infección fue con EnAd.

La Figura 25 muestra inducción de la producción de IFN γ por células T CD3 $^{+}$ humanas después del co-cultivo con células A549 infectadas con NG-347, pero no cuando la infección fue con EnAd.

15 La Figura 26 muestra esquemáticos de los casetes del transgen NG-348A, NG-420 y NG-420A.

La Figura 27 muestra la replicación del genoma y expresión del gen del genoma (niveles de mRNA) para EnAd, NG-347, y NG-348 en células del fibroblasto MRC-5 comparado con
20 células tumorales A549.

La Figura 28 muestra la expresión de CD80 y mRNA del transgen anti-CD3-scFv y proteína del transgen CD80 (citometría de flujo) para el virus NG-348 en células del fibroblasto MRC-5 comparado con células tumorales A549

25 La Figura 29 muestra el mRNA del transgen CD80 y la

proteína del transgen CD80 para el virus NG-347 en células del fibroblasto MRC-5 comparado con células tumorales A549.

La Figura 30 muestra los niveles de proteína secretada y mRNA de MIP1 α e IFN α generados por el virus NG-
5 347 en células del fibroblasto MRC-5 comparado con células tumorales A549.

La Figura 31 muestra la replicación del genoma y expresión del gen del hexón (niveles de mRNA) para EnAd, NG-347, y NG-348 en cultivos de células T humanas purificadas.

10 La Figura 32 muestra el mRNA del transgen CD80 y anti-CD3 scFv y expresión de la proteína (citometría de flujo) para el virus NG-348 en células T humanas comparado con células tumorales A549.

La Figura 33 muestra el mRNA del transgen CD80 y
15 proteína del transgen CD80 para el virus NG-347 en células T humanas purificadas comparado con células tumorales A549.

La Figura 34 muestra el mRNA de transgen de IFN α y MIP1 α generado por el virus NG-347 en células T comparado con células tumorales A549

20 La Figura 35 muestra la replicación del genoma NG-347 y NG-348 y expresión de gen del exón por PBMCs humanas comparado con células tumorales A549.

La Figura 36 muestra el mRNA CD80 y anti-CD3 scFv generado por el virus NG-348 por PBMCs comparadas con células
25 tumorales A549.

La Figura 37 muestra mRNA CD80, $IFN\alpha$ y $MIP1\alpha$ generados por el virus NG-347 por PBMCs comparadas con células tumorales A549.

La Figura 38 muestra la activación similar de
5 células dendríticas humanas por partículas del virus EnAd, NG-347 y NG-348, como se mide por la regulación descendente de la expresión de CD14 y regulación ascendente de CD80 en la superficie celular.

La Figura 39 muestra la secreción de proteína $MIP1\alpha$
10 e $IFN\alpha$ mediada por partículas a partir de PBMCs cultivadas con NG-348 (A) o NG-347 (B) comparado con EnAd.

La Figura 40 muestra la replicación del genoma NG-347 o NG-348 en co-cultivos o células T o PBMCs con células de fibroblasto MRC-5 comparado con co-cultivos con células
15 tumorales A549.

La Figura 41 muestra $INF\gamma$ secretado por PBMCs o células T co-cultivados con células de fibroblasto MRC-5 comparado con células tumorales A549, y tratadas con el virus EnAd o NG-348.

20 La Figura 42 muestra $MIP1\alpha$ e $IFN\alpha$ secretado por células dendríticas humanas tratadas con partículas del virus EnAd, NG-347 o NG-348.

La Figura 43 muestra la activación del gen reportero NF κ B e IFN en células T del reportero JurkatDual
25 co-cultivadas con células tumorales A549 infectadas con EnAd,

NG-347 o NG-348.

La Figura 44 muestra la actividad del reportero de luciferasa NF κ B generada por células T reporteras JurkatDual co-cultivadas con células tumorales A549 HCT-116, DLD y HT29
5 tratadas con EnAd, NG-347, NG-348 o NG-420.

La Figura 45 muestra la actividad del reportero de luciferasa NF- κ B generada por células JurkatDual co-cultivadas con ya sea células tumorales A549 o HT29 infectadas con el virus NG-348 y virus NG-420 como una
10 función de las partículas del virus agregadas.

La Figura 46 muestra las farmacocinéticas de EnAd y el virus NG-348 en sangre; niveles de citocina en sangre después de la exposición a EnAd o virus NG-348; biodistribución del tejido de virus EnAd o NG-348, 6 o 24
15 horas después de la administración IV a ratones CD1.

La Figura 47 muestra las farmacocinéticas en sangre de virus EnAd, NG-347 y NG-348 después de la administración IV a ratones CB17-SCID que portan un xenoinjerto de tumor HCT-116 subcutáneo.

La Figura 48 muestra la distribución del tejido de virus EnAd, NG-347 y NG-348, 6 horas post-dosificación intravenosa en ratones CB17-SCID que portan el tumor, y genomas del virus en xenoinjertos tumorales HCT-116 en el día 7 y día 14-21 después de la dosificación intravenosa o intra-
25 tumoral de EnAd, NG-347 y NG-348.

La Figura 49 muestra el mRNA del hexón del virus generado en xenoinjertos de tumor HCT-116 por virus EnAd, NG-347 o NG-348 en el día 7 o 14-21 después de la dosificación intravenosa o intra-tumoral.

5 La Figura 50 muestra los niveles de mRNA para hexón y transgen CD80 en xenoinjertos tumorales HCT-116, 7 o 21 días después de la dosificación intravenosa con el virus NG-348.

10 La Figura 51 muestra los niveles de mRNA para transgenes que codifican anti-CD3 ScFv y CD80 en xenoinjertos tumorales HCT-116, 7 o 14-21 días después de la dosificación IV con el virus NG-348.

15 La Figura 52 muestra niveles de mRNA de transgenes de MIP1 α e IFN α en xenoinjertos de tumor HCT-116, 7 o 14-21 días después de la dosificación intravenosa con el virus NG-347.

20 La Figura 53 muestra la expresión de la proteína CD80 en xenoinjertos de tumor HCT-116, 7 y 21 días después de una dosis intravenosa del virus NG-348; y muestra la expresión de la proteína MIP1 α y CD80 en tumores HCT-116 después de una dosis intravenosa del virus NG-347.

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

25 SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de ADN B γ correspondiente a, y que incluyen los pb 29345- 29379 del genoma EnAd.

SEQ ID NO: 2 dominio PDGF TM.

SEQ ID NO: 3 SECUENCIA ACEPTORA DE EMPALME.

SEQ ID NO: 4 SECUENCIA ACEPTORA DE EMPALME.

5 SEQ ID NO: 5 secuencia de poliadenilación
(secuencia polyA tardía SV40).

SEQ ID NO: 6 Secuencia de Entrada de Ribosoma
Interno (IRES).

SEQ ID NO: 7 Secuencia peptídica P2A auto-
escindible de alta eficiencia.

10 SEQ ID NO: 8 Secuencia peptídica F2A auto-
escindible de alta eficiencia.

SEQ ID NO: 9 Secuencia peptídica E2A auto-
escindible de alta eficiencia.

15 SEQ ID NO: 10 Secuencia peptídica T2A auto-
escindible de alta eficiencia.

SEQ ID NO: 11 secuencia de aminoácido de CD80
humano.

SEQ ID NO: 12 Secuencia de aminoácido de interferón
humano.

20 SEQ ID NO: 13 secuencia de aminoácido Flt3 de
ligando soluble humano.

SEQ ID NO: 14 secuencia de aminoácido de proteína
inflamatoria del macrófago humano (isoforma LD78b).

25 SEQ ID NO: 15 Forma anclada de membrana de la
cadena única Fv CD3 anti-humana.

SEQ ID NO: 16 secuencia del genoma del virus NG-330 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que codifica el antígeno de activación del linfocito T, CD80, insertado en la región B γ . El casete del transgen contiene
5 una SSA al 5', una secuencia de ADN CD80 humana y una poly (A) al 3'.

SEQ ID NO: 17 secuencia de genoma del virus NG-343 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que codifica IFN α , y CD80, insertado en la región B γ . El casete
10 del transgen contiene una SSA al 5', secuencia de cADN del IFN α , péptido P2A, secuencia de cADN CD80 y un poly(A) al 3'.

SEQ ID NO: 18 secuencia de genoma del virus NG-345 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que codifica ligando Flt3, MIP1 α e IFN α , insertado en la región
15 B γ . El casete del transgen contiene una SSA al 5', cADN del ligando Flt3, secuencia peptídica P2A, secuencia de cADN MIP1 α .

SEQ ID NO: 19 secuencia de genoma del virus NG-346 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que
20 codifica ligando Flt3, MIP1 α y CD80, insertado en la región B γ . El casete del transgen contiene una SSA al 5', secuencia de cADN del ligando Flt3, secuencia peptídica P2A, cADN MIP1 α .

SEQ ID NO: 20 secuencia de genoma del virus NG-347
25 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que

codifica IFN α , MIP1 α y CD80, insertado en la región B γ . El casete del transgen contiene una SSA al 5', secuencia de cADN del IFN α , secuencia peptídica P2A, secuencia de cADN MIP1 α , T2A.

- 5 SEQ ID NO: 21 Genoma EnAd.
 SEQ ID NO: 22 Región E2B del genoma EnAd (BP 10355-5068).

 SEQ ID NO: 23 E3 REGIÓN DE EnAd.
 SEQ ID NO: 24 Una secuencia no codificante para
10 inclusión en B α .

 SEQ ID NO: 25 Una secuencia no codificante para
 inclusión en B γ .

 SEQ ID NO: 26-34 Secuencias enlazadoras bisagra.
 SEQ ID NO: 35-74 Secuencia enlazadora flexible.
15 SEQ ID NO: 75 y 76 Secuencia enlazadora rígida.
 SEQ ID NO: 77-90 Secuencia enlazadora.

 SEQ ID NO: 91 PDGFR receptor A.
 SEQ ID NO: 92 PDGFR receptor B.

 SEQ ID NO: 93 Factor 1 del crecimiento similar a la
20 insulina.

 SEQ ID NO: 94 IL6-R.
 SEQ ID NO: 95 CD28.

 SEQ ID NO: 96 Secuencia de genoma del virus NG-348
 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que
25 codifica una forma quimérica anclada a la membrana de la

cadena única Fv anti-human CD3e y el antígeno de activación del linfocito T, CD80 insertado en la región B_γ.

SEQ ID NO: 97 Ácido nucleico que codifica el OKT3-scFv atado a la membrana.

5 SEQ ID NO: 98 Secuencia del casete del transgen para NG-348.

SEQ ID NO: 99 Forma anclada a la membrana del scFv CD3 anti-humana con etiqueta V5 C-terminal.

10 SEQ ID NO: 100 etiqueta V5 (variante de 9 aminoácidos).

SEQ ID NO: 101 secuencia de genoma del virus NG-348A que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que codifica una forma quimérica anclada a la membrana de la cadena única Fv anti-human CD3e con la etiqueta V5 C-terminal y el antígeno de activación del linfocito T, CD80 insertado en la región.

20 SEQ ID NO: 102 secuencia de genoma del virus NG-420 que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que codifica una forma quimérica anclada a la membrana de la cadena única Fv anti-human CD3e insertado en la región B_γ. El casete del transgen contiene una SSA al 5'.

25 SEQ ID NO: 103 secuencia de genoma del virus NG-420A que comprende el genoma EnAd con un casete del transgen que codifica una forma quimérica anclada a la membrana de la cadena única Fv anti-human CD3e y una etiqueta V5 C-terminal,

insertado en la región BY. El casete del transgen contiene un

SEQ ID NO: 104 Enlazador

SEQ ID NO: 105 Secuencia que comprende un codón de inicio.

5 SEQ ID NO: 106 etiqueta c-myc.

SEQ ID NO: 107 etiqueta c-myc con espaciador de aminoácido en el N- y C-terminal

SEQ ID NO: 108 dominio espaciador-etiqueta c-myc-espaciador PDGFT

10 SEQ ID NO: 109 Genoma EnAD completamente sintético con sitio de clonación incorporado por inserción del casete del transgen como en el plásmido pEnAd2.4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

B7 es una familia de proteínas.

15 Una proteína B7 codificada por virus oncolíticos de la presente descripción puede ser útil debido a que el dominio extracelular del miembro de la familia de proteínas en general modula una función biológica, por ejemplo, el dominio extracelular B7-1 puede ser empleado para cebar o

20 estimular células T. La función biológica actual es específica al dominio extracelular de cada proteína B7 dada (es decir, en general, diferentes miembros de proteínas de la familia B7 tienen diferentes funciones). Otras funciones de las proteínas B7, tales como B7-1 y/o B7-2 pueden incluir la

25 capacidad para unirse a CD28 y/o CTLA-4, y en particular para

señalar o activar la cascada o cascadas de señalización relevantes.

En adición o alternativamente el dominio de la transmembrana de las proteínas B7 puede ser empleado para
5 dirigir proteínas codificadas por un virus de la presente descripción a la superficie de una célula cancerosa, por ejemplo, fusionando el dominio de la transmembrana con el C-término de la proteína relevante.

La proteína B7 como se emplea en la presente, a
10 menos que el contexto lo indique de otro modo, se refiere a la secuencia de longitud completa de una proteína a partir de la familia B7 o una secuencia al menos 95% similar o idéntica a esta (tal como 96%, 97%, 98%, 99% o 100% similar o idéntica a esta a lo largo de la totalidad de la secuencia relevante).
15 La familia B7 incluye B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7. Cuando la proteína de longitud completa es empleada, entonces al menos una función biológica normal de la proteína en general estará presente.

La proteína de longitud completa como se emplea con
20 respecto a la familia B7, se refiere al menos al dominio extracelular, que incluye proteínas B7 quiméricas en donde la secuencia de la quimera tiene la estructura y función de una proteína B7 y en donde las secuencias que constituyen la quimera son seleccionadas a partir de proteínas en la familia
25 B7. Los elementos en un fragmento o proteína B7 de longitud

completa pueden ser a partir de la misma o diferentes proteínas B7. De este modo, en una modalidad el fragmento o proteína B7 es quimérico.

Las proteínas B7 quiméricas como se emplean en la presente se refieren a donde sustancialmente todas las secuencias que constituyen la quimera son a partir de una proteína B7, por ejemplo, al menos 98% de la secuencia de la quimera son fragmentos de proteínas B7 fusionadas en conjunto. De este modo, un fragmento quimérico como se emplea en la presente se refiere a un fragmento que comprende una secuencia a partir de dos o más proteínas B7 diferentes.

En una modalidad la proteína B7 de longitud completa comprende el dominio extracelular, por ejemplo, a partir de una proteína B7 única, tal como B7-1 y/o B7-2.

En una modalidad la proteína B7 de longitud completa comprende el dominio extracelular y el dominio de la transmembrana, por ejemplo, a partir de la misma proteína B7 o alternativamente el dominio extracelular a partir de una proteína B7 (tal como B7-1 y/o B7-2) y un dominio de la transmembrana o equivalente, tal como anclaje de membrana lípida, a partir de una proteína completamente diferente.

En una modalidad una proteína B7 quimérica de longitud completa puede comprender un dominio extracelular de una proteína B7 (tal como B7-1 y/o B7-2) y la transmembrana a partir de una proteína B7 diferente.

En una modalidad la proteína B7 de longitud completa comprende el dominio extracelular, el dominio de la transmembrana y dominio intracelular, por ejemplo, todos a partir de la misma proteína B7 o a partir de dos o más
5 proteínas B7 diferentes.

El fragmento activo de una proteína B7 como se emplea en la presente se refiere a un fragmento que tiene al menos una función de una proteína B7, por ejemplo, para facilitar la expresión en la superficie de la célula
10 cancerosa u otra función biológica de una proteína B7.

En una modalidad el fragmento tiene al menos 50% de la actividad de la proteína de longitud completa, tal como 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100% de la actividad de la proteína de longitud completa.

15 En una modalidad el fragmento activo comprende o consiste de un dominio extracelular B7 o una secuencia al menos 95% similar o idéntica a esta, tal como 96, 97, 98, 99 o 100% similar o idéntica.

En una modalidad el fragmento B7 comprende o
20 consiste de un dominio de la transmembrana a partir de una proteína B7 en particular una descrita en la presente, tal como B7-1. Empleando el último, se piensa contribuye a la expresión en la superficie celular.

En una modalidad el fragmento B7 activo puede ser
25 parte de un dominio extracelular. Un fragmento activo, por

ejemplo, un fragmento de la transmembrana o un fragmento más largo que comprende más dominios B7, puede ser empleado en una proteína de fusión con una proteína adicional, por ejemplo, para facilitar la expresión de la proteína adicional
5 en la superficie de la célula cancerosa.

El fragmento más largo como se emplea en la presente no se refiere al tamaño o peso *per se*, sino a un repertorio más grande de información de secuencia (es decir, el fragmento comprende secuencias a partir de al menos dos B7
10 dominios) los cuales, a su vez, pueden proporcionar más funcionalidad.

En una modalidad el fragmento más largo comprende alguna actividad biológica de la proteína B7 relevante. En una modalidad un fragmento B7 activo es un fragmento que
15 retiene la actividad biológica esencial de la proteína de longitud completa, por ejemplo, la capacidad para cebar o activar células T.

La actividad de un fragmento de proteína dado puede ser analizado en un ensayo *in vitro* relevante, por ejemplo,
20 usando proteína de longitud completa como un comparador, por ejemplo, empleando un ensayo descrito en los Ejemplos de la presente. Donde el fragmento activo es un dominio de la transmembrana la actividad puede ser evaluado analizando la expresión de superficie en las células de la proteína
25 relevante a la cual el dominio de la transmembrana está

unido, por ejemplo, usando un ensayo descrito en los Ejemplos de la presente.

Cuando la proteína B7 de longitud completa es parte de una proteína de fusión, entonces la porción B7 puede ser
5 ligada a la proteína adicional por un enlace amida entre el extremo de una secuencia y el comienzo de la siguiente secuencia de proteína o conectada por un enlazador. Ejemplos de enlazadores se proporcionan abajo.

Una proteína B7 de longitud completa que comprende
10 un dominio de la transmembrana puede ser empleada para presentar el dominio extracelular de la proteína B7 y la proteína o fragmento fusionado o ligado a este en la superficie de la célula cancerosa infectada. En general en esta modalidad la proteína B7 estará unida a la superficie de
15 la célula cancerosa y la "otra" proteína estará en el N-término y en el lado extracelular de la superficie de la célula cancerosa.

Habiendo dicho que las proteínas pueden ser arregladas como se desea, por ejemplo, con el dominio
20 extracelular B7 en el N-terminal, fusionado o ligado a su C-terminal o a la siguiente proteína o fragmento, el cual a su vez está fusionado o ligado en el C-terminal con el dominio de la transmembrana, por ejemplo, un dominio de la transmembrana a partir de una proteína B7.

25 En general cuando una proteína B7 de longitud

completa es empleada en una proteína de fusión, entonces tanto la proteína B7 como la proteína adicional tendrán una función biológica.

La proteína de fusión como se emplea en la presente
5 se refiere al menos a dos proteínas o fragmentos o una combinación de al menos una proteína y al menos un fragmento fusionado directamente o conectado entre sí, por ejemplo, por un enlazado.

Fusionado, como se emplea en la presente en
10 general, se refiere a un enlace amida entre el extremo de un polipéptido (o proteína/fragmento) y el comienzo del siguiente polipéptido (o proteína/fragmento).

Ligado, a menos que el contexto lo indique de otro modo, se refiere en donde dos entidades, tales como dos
15 secuencias de polipéptido están conectadas mediante un enlazador. Un enlazador es una secuencia la cual no está naturalmente presente en ya sea un polipéptido o una secuencia, la cual no está presente en tal posición particular con relación a ambos polipéptidos.

20 En una modalidad la proteína de fusión comprende una proteína B7 o un fragmento activo de la misma. Las proteínas de fusión que comprenden fragmentos o proteína B7 y proteínas adicionales no son referidos como proteínas quiméricas en la presente. En general, la proteína de fusión
25 como se emplea en la presente se refiere a una combinación de

una proteína B7 o fragmento de la misma y otra proteína/fragmento no B7.

Solamente fragmentos que contienen proteínas a partir de proteínas B7 diferentes son referidos como quiméricos en la presente, como se describe anteriormente.

En una modalidad las proteínas de fusión de la presente descripción no comprenden una proteína B7 o fragmento activo de la misma y son codificadas por un virus de la presente descripción en adición a la proteína B7 o fragmento de la misma.

De este modo, los virus de la presente descripción pueden codificar entidades en adición a la proteína B7 o fragmento activo de la misma, tales entidades incluyen además proteínas.

Familia B7

En una modalidad la B7 se selecciona independiente a partir de B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7, fragmentos activos de las mismas, y combinaciones de las mismas. En una modalidad la proteína B7 es B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) o un fragmento activo de cualquiera de las mismas y combinaciones de las mismas, en particular B7-1 o un fragmento activo de la misma.

Las proteínas B7 incluyen B7-1 (también conocida como CD80 número uniprot P33681), B7-2 (también conocida como CD86 número uniprot P42081). Estas proteínas se unen a CD28 y

CTLA-4.

En una modalidad la CD80 tiene la siguiente secuencia:

```

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCG
5  HNVSV EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEG
  TYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIP TSNIRRIICSTSGGFPEPHL
  SWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNH SFMCLIKYGH LRVNQTFNWNTT
  KQEHFPDNL LPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV SEQ ID
NO: 11

```

10 Otras proteínas B7 incluyen B7-DC (también conocida como PDCD1LG2 y PD-L2 número uniprot Q9BQ51), B7-H1 (también conocida como PD-L1 y CD274: número uniprot Q9NZQ7). Ambas proteínas se unen a PD-1.

15 Ligando 1 de muerte programada (PD-L1) es una proteína de la transmembrana de tipo 1 de 40 kDa que se ha especulado que juega un papel mayor en la supresión del sistema inmune. Parece que la regulación ascendente de PD-L1 puede permitir a los cánceres evadir el sistema inmune hospedero. Un análisis de 196 especímenes tumorales de

20 pacientes con carcinoma de células renales encontró que la alta expresión del tumor de PD-L1 se asocia con la agresividad incrementada del tumor y un riesgo de muerte incrementado 4.5 veces. Pacientes con cáncer de ovario con expresión superior de PD-L1 tienen un pronóstico

25 significativamente más pobre que aquellos con la expresión más

baja. La expresión de PD-L1 se correlaciona inversamente con el conteo de linfocitos T CD8+ intraepiteliales, sugiriendo que el PD-L1 en células tumorales puede suprimir las células T CD8+ antitumorales. El efecto podría ser dependiente del tipo de tumor; un estudio en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas mostró que la proteína PD-L1 mayor y la expresión de mRNA está asociada con el infiltrado linfocítico local incrementado y supervivencia prolongada. Un número de anticuerpos anti-PDL1 han sido mostrados por ser de interés en tratar varios cánceres en ensayos clínicos.

En una modalidad la proteína B7-DC y/o B7-H1 o fragmento de la misma empleado en el virus de la presente descripción no estimula la supresión inmune, por ejemplo, es mutado para remover la función supresora inmune.

Alternativamente, un virus que codifica el dominio extracelular de B7-H1 en una forma no mutada puede ser empleado para tratar cánceres apropiados, donde la regulación ascendente de PD-L1 está asociada con un pronóstico bueno/mejorado, tal como cáncer de pulmón.

En una modalidad al menos el citoplásmico (dominio intracelular) de B7-DC y/o B7-H1 es suprimido o no funcional. Mientras no se desee ser ligado por teoría, existe evidencia para sugerir que la remoción del dominio intracelular reduce la resistencia de las células cancerosas a la lisis, Blood 2008, Abril 1; 111(7) 3635-3643.

En una modalidad solamente el fragmento del dominio de la transmembrana De B7-DC y/o B7-H1 es empleado. En una modalidad las siguientes proteínas no son proporcionadas como proteínas de longitud completa B7-DC y B7-H1 con una
5 actividad biológica relevante.

Otras proteínas B7 incluyen B7-H2 (también conocida como ICOSLG, B7RP1, CD275: Número uniprot 075144) la cual se une a ICOS, B7-H3 (también conocida como CD276: Número uniprot Q5ZPR3), B7-H4 (también conocida como VTCN1: Número
10 uniprot Q727D3), B7-H5 (también conocida como VISTA, receptor plaquetario Gi24, SISP1), B7-H6 (también conocida como NCR3LG1, NR3L1) la cual se une a NKp30, B7-H7 (también conocida como HHLA2) la cual se une a CD28H.

En una modalidad el fragmento solamente comprende
15 el dominio de la transmembrana de cualquiera de B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 y B7-H7.

Proteínas individuales incluyen proteínas únicas, es decir, proteínas o fragmentos activos de los mismos que no son parte de una proteína de fusión (que incluyen proteínas
20 quiméricas), y también proteínas de fusión. En una modalidad las proteínas individuales son proteínas únicas (que incluyen fragmentos activos de las mismas).

En una modalidad el dominio citoplásmico de la proteína B7 está presente. En una modalidad el dominio
25 citoplásmico está ausente. La ausencia del dominio

citoplásmico puede reducir o eliminar la señalización intracelular a la célula de cáncer, lo cual es relevante a una o más modalidades discutidas posteriormente.

"Dominios de la Transmembrana"

5 En una modalidad se emplea un dominio de la transmembrana distinta de una derivada a partir de una proteína B7 para expresar una proteína (que incluye una proteína de fusión) codificada por un virus de la presente descripción en la superficie de una célula de cáncer
10 infectada, por ejemplo, el dominio de la transmembrana puede ser empleada para presentar un fragmento de proteína B7 activa u otra proteína de interés en la superficie de la célula cancerosa infectada. Alternativamente, puede ser empleada para presentar una proteína de fusión, por ejemplo,
15 que comprende una proteína B7 o fragmento activo de la misma en tal superficie. En una modalidad el dominio de la transmembrana a partir de un receptor PDGF o fragmento de la misma es empleado para expresar una B7 y/o otra en la superficie de la célula cancerosa.

20 En una modalidad una secuencia de anclaje o apriete de la transmembrana empleada en la presente descripción comprende un dominio PDGFR TM (por ejemplo, ala513-arg561), tal como AVGQDTQEVIVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKPR (SEQ ID NO: 2).

25 En una modalidad una secuencia de anclaje o apriete

empleada en la presente descripción comprende una etiqueta unida, por ejemplo, a un receptor de PDGF o fragmento de la misma, tal como dominio PDGFR TM, en particular SEQ ID NO: 2.

Las etiquetas adecuadas incluyen etiquetas His,
 5 etiquetas Flag, etiquetas c-myc y similares. Más específicamente el anclaje o apriete puede comprender una etiqueta c-myc, por ejemplo, de la SEQ ID NO: 106 EQKLISEEDL seguida por un dominio PDGFR TM empleado, (por ejemplo, ala513-arg561), tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2
 10 AVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR.

En una modalidad la etiqueta c-myc comprende un espaciador o aminoácidos espaciadores en el extremo 3' y/o 5', por ejemplo, gSEQKLISEEDLn (SEQ ID NO: 107 en donde las letras minúsculas representan los aminoácidos los cuales son
 15 agregados a las etiquetas como espaciadores).

En una modalidad la secuencia de anclaje o apriete empleada es gSEQKLISEEDLnAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR (SEQ ID NO: 108) en donde la letra inferior representa
 20 espaciadores de aminoácido).

En general la proteína/polipéptido al cual el anclaje o apriete está unida no comprende una cadena de detención.

Una proteína o proteínas exógenas codificadas por
 25 el virus de conformidad con la presente descripción en

general comprenderán una secuencia líder (también referida como un péptido señal). Una secuencia líder es, por ejemplo, una secuencia de aproximadamente 5 hasta 30 aminoácidos de longitud localizados en el N-terminal de la proteína o polipéptido.

En una modalidad la secuencia líder para la proteína que será expresada en la superficie de la célula cancerosa es humana, por ejemplo, HuVHSS.

En una modalidad la estructura del casete ORF es como sigue:

LS-POLY-ETIQUETA-TM_D

en donde

LS es una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia líder humana;

POLY es un polinucleótido que codifica un polipéptido o proteínas de interés, en particular una descrita en la presente;

TAG es una etiqueta, por ejemplo, una descrita en la presente, tal como c-myc, en particular SEQ ID NO: 100 o 106;

TM_D es un dominio TM, por ejemplo, un dominio PDGFR TM, por ejemplo, SEQ ID NO: 2.

Cuando el polipéptido es un scFv entonces el ORF puede ser como sigue:

LS-VAR₁-ENLACE-VAR₂-ETIQUETA-TM_D

en donde

LS es una secuencia líder, por ejemplo, una secuencia líder humana;

VAR₁ es un polinucleótido que codifica una región
5 variable tal como la región VH;

ENLACE es un enlazador, por ejemplo, como se describe en la presente, tal como un enlazador con base en las unidades de G₄S, en particular SEQ ID NO: 104
GGGGSGGGSGGGGS;

10 VAR₂ es un polinucleótido que codifica una región variable, tal como una región VL;

ETIQUETA es una etiqueta, por ejemplo, una descrita en la presente, tal como c-myc, en particular SEQ ID NO: 100 o 106;

15 TM_D es un dominio TM, por ejemplo, un dominio PDGFR TM, por ejemplo, SEQ ID NO: 2.

La descripción también se extiende a modalidades, en particular aquellas descritas específicamente en la presente, las cuales comprenden una etiqueta en el N- o C-
20 término de las cadenas de polipéptido, tales como aquellas que residen dentro o en el exterior de la membrana. De este modo, una etiqueta de C-términos localizada dentro de la membrana es ventajosa debido a que no es probable que interfiera con la unión o función del polipéptido.

25 Habiendo dicho esto, expresar la etiqueta en el N-

terminal de una proteína expresada en la superficie puede ser útil en algunas situaciones debido a que puede facilitar el aislamiento, identificación y purificación de células que expresan la proteína.

5 En una modalidad una combinación de un dominio de la transmembrana y una secuencia de señal secretora se emplean para expresar una proteína codificada por el virus (por ejemplo, como se describe en la presente) en la superficie de una célula de cáncer infectada. Los presentes
10 inventores han mostrado que las proteínas codificadas son expresadas solamente en células las cuales son permisivas a la infección por el virus oncolítico, es decir, células cancerosas.

 En una modalidad el fragmento empleado para
15 expresar la proteína en la superficie de la célula cancerosa infectada (tal como el fragmento de la transmembrana) se selecciona desde aproximadamente 20 hasta 25 aminoácidos hidrofóbicos los cuales forman un hélice alfa de la transmembrana, por ejemplo, a partir de las proteínas que
20 incluyen el receptor PDGF, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, receptor IL-6, CD28, glicoforina, receptor de LDL, proteína HA de la influenza, receptor de insulina, receptor de Asialoglicoproteína, receptor de transferrina.

25 En una modalidad el fragmento empleado para

expresar la proteína en la superficie de la célula cancerosa infectada (tal como el fragmento de la transmembrana) es seleccionado a partir del grupo que comprende las secuencias del dominio TM (porciones mínimas) dadas en la SEQ ID NO: 91, 92, 93, 94 o 95:

SEQ ID NO:	Nombre	SECUENCIA
91	PDGFR Receptor A	AVLVLLVIVIIISLIVLVVIW
92	PDGFR Receptor B	VVISAILALVVLTHSLIILI
93	FACTOR 1 DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA	IIIGPPLIFVFLFSVVIGSIYFL
94	IL6-R	SSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVL
95	CD28	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

En una modalidad el dominio de la transmembrana empleado se deriva a partir un receptor acoplado a la proteína G o antígeno S a partir de hepatitis B.

En una modalidad una proteína de fusión que comprende un dominio extracelular de longitud completa de una proteína B7 o fragmento y también un dominio de la transmembrana derivado a partir de una proteína distinta de B7 es arreglado de manera que la proteína B7 está localizada en el extremo terminal de la proteína de fusión distal a partir de la superficie de la célula cancerosa, es decir, en el exterior de la célula cancerosa que encara el espacio extracelular.

VIRUS

Teniendo la secuencia de ADN que codifica una

proteína B7 o un fragmento activo bajo el control de un promotor endógeno también es ventajoso debido a que la proteína es expresada de conformidad con el ciclo de vida del virus contrario a ser constitutivamente expresado. En la presente situación la expresión continua bajo un promotor exógeno, por ejemplo, un promotor fuerte como el promotor CMV, puede producir más proteína B7 que la que es necesaria para un efecto terapéutico y puede resultar en objetivos fuera del objetivo.

Alternativas a los dominios de la transmembrana para expresar proteínas en la superficie de la célula cancerosa infectada incluyen procedimientos que emplean anclaje glicofosfolípido (también referido como un anclaje de GPI) unido al aminoácido C-terminal de la proteína o fragmento extracelular (Low et al 1986, Cross 1987, Low and Saltiel 1988, Ferguson and William 1988). Los anclajes de glicofosfolípidos adecuados, para uso en la presente descripción incluyen aquellos a partir de Thy-1, N-CAM y DAF.

En una modalidad el virus oncolítico de conformidad con la presente descripción es un adenovirus, por ejemplo, un adenovirus del grupo B. En una modalidad el virus de conformidad con la presente descripción es un virus quimérico, por ejemplo, EnAd. En una modalidad el adenovirus es de replicación competente.

En una modalidad el virus es de replicación

deficiente y proporcionado como un vector viral.

En una modalidad la secuencia que codifica la proteína B7 o fragmento activo de la misma está localizada entre el codón de detención y el sitio de reconocimiento polyA del gen adenoviral L5 y el codón de detención y sitios
5 de reconocimiento polyA del gen E4.

En una modalidad la secuencia que codifica la proteína B7 o fragmento activo de la misma está localizada entre aproximadamente pb 29356 y aproximadamente 29357 del
10 genoma EnAd, por ejemplo, como se muestra en la SEQ ID NO: 21, o una posición equivalente a esta. La persona experta entenderá que el valor numérico absoluto de la ubicación puede cambiar con base en cómo se asigna la numeración. Sin embargo, la posición relativa del gen insertado permanece la
15 misma irrespectivo de los valores numéricos absolutos empleados.

En una modalidad el adenovirus oncolítico de conformidad con la presente descripción tiene a formula (I):

$$5' \text{ ITR-B}_1\text{-B}_A\text{-B}_2\text{-B}_X\text{-B}_B\text{-B}_Y\text{-B}_3\text{-3' ITR (I)}$$

20 en donde:

B es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B (en particular E1A, E1B o E1A-E1B);

B_A es E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B₂ es un enlace o comprende E3 o un transgen, por
25 ejemplo, bajo un promotor endógeno o exógeno;

B_X es un enlace o una secuencia de ADN que comprende: un sitio de restricción, uno o más transgenes o ambos;

B_B comprende L5;

5 B_Y comprende un transgen que codifica una proteína B7 o un fragmento activo de la misma; y

B_3 es un enlace o comprende E4.

En una modalidad el virus oncolítico tiene una fórmula (Ia):

10 $5' \text{ ITR}-B_1-B_A-B_2-B_B-B_Y-B_3-3' \text{ ITR (Ia)}$

en donde:

B_1 es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B (en particular E1A, E1B o E1A-E1B);

B_A es E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

15 B_2 es un enlace o comprende E3;

B_B comprende L5;

B_Y comprende un transgen que codifica una proteína B7 o un fragmento activo de la misma; y

B_3 es un enlace o comprende E4.

20 En una modalidad el genoma del virus en constructos de fórmula (I) y/o (Ia) es de Ad11 o EnAd, en particular EnAd.

En una modalidad el transgen que codifica la proteína B7 o fragmento activo de la misma, está bajo el
25 control de un promotor endógeno, por ejemplo, el promotor

tardío mayor.

Elementos Reguladores

En una modalidad B_Y comprende un casete del transgen, tal casete comprende un transgen que codifica una
5 proteína B7 o fragmento de la misma y un elemento regulador, tal como una combinación de elementos reguladores.

En una modalidad el elemento regulador es una secuencia aceptora de empalme.

En una modalidad el elemento regulador es una
10 secuencia Kozak.

En una modalidad, por ejemplo, donde el transgen codifica una molécula de ARN policistrónica, el elemento regulador es una secuencia IRES.

En una modalidad la secuencia reguladora es una
15 secuencia peptídica auto-escindible de alta eficiencia tal como P2A, T2A, F2A, E2A.

En una modalidad la secuencia reguladora es una cola polyA.

En una modalidad existen al menos dos secuencias
20 reguladoras, por ejemplo, un aceptor de empalme y una secuencia Kozak o un aceptor de empalme y una cola polyA, o un aceptor de empalme y una secuencia IRES, o un aceptor de empalme y una secuencia P2A.

En una modalidad existen al menos tres secuencias
25 reguladoras, por ejemplo, un aceptor de secuencia de empalme,

una secuencia Kozak y cola polyA, o un aceptor de secuencia de empalme una secuencia IRES o 2A y una cola polyA; o un aceptor de secuencia de empalme, secuencia Kozak y una secuencia IRES o 2A.

5 En una modalidad existen al menos cuatro secuencias reguladoras, por ejemplo, un aceptor de secuencia de empalme, una secuencia Kozak, una secuencia IRES o 2A y una cola polyA, en particular localizada entre L5 y E4 en el orden de secuencia aceptora de empalme, secuencia Kozak, secuencia
10 IRES o 2A y una cola polyA.

En una modalidad el transgen codifica una molécula de ARN policistrónica que comprende ambos una secuencia reguladora IRES y una 2A.

Proteínas Codificadas por el Virus

15 En una modalidad el virus de la presente descripción codifica proteínas múltiples para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada en donde al menos una es una proteína B7 o un fragmento activo de la misma, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más proteínas diferentes son
20 codificadas, en particular dos o tres proteínas son codificadas por el virus para expresión en la superficie de la célula cancerosa o secreción en el espacio extracelular. La proteína en este contexto incluye una proteína de fusión. En una modalidad el virus de la presente descripción codifica
25 dos proteínas B7 diferentes, fragmentos activos de las mismas

o combinaciones de las mismas, por ejemplo, ambos para expresión en una superficie de la célula cancerosa.

En una modalidad el virus de conformidad con la presente descripción codifica una o dos proteínas para la
5 expresión de la superficie celular y una o dos proteínas las cuales no son capaces de ser ancladas en la superficie celular, por ejemplo, están propuestas para actuar con la célula cancerosa o son para secreción/liberación de las células.

10 En una modalidad una proteína B7 o fragmento activo es codificada por el virus de la presente descripción para expresión en la superficie de la célula cancerosa y una forma soluble, la cual es liberada o secretada de la célula, de la misma proteína B7 o una proteína B7 diferente (que incluye
15 fragmentos activos) también es codificada por el virus.

En una modalidad al menos dos proteínas B7 diferentes o fragmentos activos son codificadas por un virus de la presente descripción.

En una modalidad al menos una proteína expresada en
20 la superficie celular es una proteína B7 y al menos unas proteínas no ancladas a la célula (por ejemplo, secretadas) son una proteína no B7.

En una modalidad las proteínas múltiples pueden ser codificadas para ser expresada como proteínas separadas las
25 cuales son independientemente procesadas y expresadas en la

membrana de la célula cancerosa. La independencia de las proteínas en la superficie de la célula cancerosa puede hacer una contribución positiva a la activación inmune. Mientras no se desee ligar por teoría, el paquete lípido puede
5 influenciar la fluidez (es decir, la viscosidad) de la bicapa lípida en la membrana de la célula cancerosa. La viscosidad de la membrana puede afectar la rotación y orientación de las proteínas y otras bio-moléculas dentro de la membrana, de este modo afectando las funciones de estas moléculas. De este
10 modo, cuando las proteínas codificadas por el virus son localizadas como proteínas individuales y separadas dentro de la membrana de la célula cancerosa infectada, la fluidez de la bicapa lípida permite el movimiento independiente de las moléculas las cuales pueden un formato particularmente
15 adecuado, por ejemplo, similar a un formato natural que es conductivo a la función biológica.

En una modalidad las proteínas procesadas y expresadas independientemente están localizadas (ancladas) en diferentes ubicaciones, tal como ubicaciones físicamente
20 separadas, en la membrana de la célula cancerosa.

En una modalidad una o más proteínas (por ejemplo, todas las proteínas) codificadas por el virus y expresadas en la superficie de la célula cancerosa infectada no son proteínas de fusión.

25 Como se describe anteriormente en algunas

modalidades las proteínas son expresadas como una proteína de fusión.

En una modalidad el virus de la presente descripción proporciona una o más proteínas independientes
5 separadas para la expresión de la superficie celular y una o más proteínas de fusión para expresión de la superficie celular.

De este modo, en una modalidad el virus de conformidad con la presente descripción comprende secuencias
10 de ADN que codifican tales proteínas múltiples para expresión, por ejemplo, en la superficie o la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus de conformidad con la presente descripción comprende dos o más
15 transgenes, en las mismas o diferentes ubicaciones en el genoma del virus. Cuando se localizan en la misma posición en el genoma del virus las proteínas múltiples todavía serán expresadas independientemente en la superficie de la célula cancerosa.

20 En una modalidad las proteínas múltiples (que incluyen proteínas de fusión) son codificadas en diferentes ubicaciones en el genoma del virus, por ejemplo, en E3, B_x y/o B_y y son expresadas separadamente en la superficie de la célula cancerosa infectada.

25 En una modalidad las proteínas múltiples (que

incluyen proteínas de fusión) son codificadas en la misma ubicación en el genoma del virus y expresadas en conjunto en la superficie infectada de la célula cancerosa, por ejemplo, donde las proteínas codificadas son proporcionadas como una
5 proteína de fusión, en particular en donde la proteína de fusión comprende una proteína B7 o un fragmento activo de la misma.

En una modalidad la proteína B7 en la proteína de fusión es una proteína de longitud completa, en particular
10 una proteína descrita en la presente, tal como B7-1 y/o B7-2, fusionada o ligada a otra proteína de interés o un fragmento activo de la misma. En una modalidad, la proteína de fusión comprende una transmembrana a partir de una proteína B7. En una modalidad la B7 es un fragmento activo que excluye el
15 dominio de la transmembrana. En la última modalidad una transmembrana distinta de una derivada a partir de una proteína B7 puede ser empleada para asegurar que la proteína de fusión esté presente en la superficie de la célula cancerosa infectada.

20 En una modalidad las proteínas múltiples son codificadas en la misma ubicación en el virus y son expresadas como una o más proteínas de fusión en conjunto en la superficie de la célula cancerosa infectada.

Cuando la ubicación del(los) gen(es) que codifican
25 una proteína o proteína(s) de interés en el virus es la

misma, entonces los genes pueden, por ejemplo, ser ligados por una secuencia IRES o un péptido 2A.

En una modalidad el virus de conformidad con la presente descripción comprende un "segundo" transgen y
5 opcionalmente un tercer transgen (es decir, una o más de tales proteínas múltiples, por ejemplo, que codifican un polipéptido seleccionado a partir del grupo que comprende una citocina, una quimiocina, un ligando, y una molécula de anticuerpo, tal como una molécula de anticuerpo antagonista,
10 y una molécula de anticuerpo agonista.

En una modalidad la proteína o proteínas adicionales es/son seleccionadas independientemente a partir del grupo que comprende un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando de proteína que se une a CD3, CD28,
15 CD80, CD86, 4-1BB, GITR, OX40, CD27, CD40 y combinaciones, por ejemplo, en formas adecuadas para expresión en la superficie de una célula cancerosa.

En una modalidad la proteína adicional es un anticuerpo anti-CD3, por ejemplo, independientemente
20 seleccionado a partir de un Muromonab-CD3 (también conocido como OKT3), orelizumab (también conocido como TRX4), teplizumab (también conocido como hOKT3 γ 1(Ala-Ala)), o visilizumab.

En una modalidad el anticuerpo anti-CD3 está en la
25 forma de un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un scFv que

es parte de una proteína de fusión con la región de la transmembrana de otra proteína, por ejemplo, el dominio de la transmembrana a partir del receptor PDGF o a partir de la forma de la superficie celular de IgG.

5 En una modalidad una molécula de anticuerpo es un inhibidor (anticuerpo antagonista) se selecciona independientemente a partir del grupo que comprende un inhibidor de un factor de angiogénesis, tal como una molécula de anticuerpo anti-VEGF, e inhibidor de factores de
10 desactivación de células T, tal como una molécula de anticuerpo anti-CTLA-4, anti-PD1 o anti-PDL1. En una modalidad la molécula de anticuerpo es un agonista seleccionado independientemente a partir del grupo que comprende anticuerpos a CD40, GITR, OX40, CD27 y 4-1BB.

15 En una modalidad un transgen adicional codifica una citocina, o variante soluble del mismo seleccionado a partir del grupo que comprende IL-2, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\gamma$, GM-CSF, IL-15, IL-12 y ligando 3 de tirosina cinasa relacionada con fms (FLT3L). Ventajosamente, uno o más de este grupo de proteínas
20 es expresado por el virus, en particular como una proteína libre secretada a partir de la célula cancerosa, puede ser particularmente adecuada para estimular una respuesta inmune *in vivo* a la célula cancerosa.

 En una modalidad un transgen adicional codifica una
25 quimiocina, seleccionada a partir del grupo que comprende

MIP1-alfa, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19 y CCL21. Ventajosamente, uno o más de este grupo de proteínas es expresado por el virus como una proteína libre la cual puede ser secretada a
5 partir de la célula cancerosa, puede ser particularmente adecuado para atraer células inmunes y estimular una respuesta inmune a la célula cancerosa *in vivo*.

En una modalidad en adición al menos a la proteína B7 o fragmento activo de la misma expresado en la superficie
10 de la célula cancerosa infectada, una o más moléculas también son expresadas en la superficie y/o secretadas.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas.

15 De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y un anticuerpo anti-CD3 (agonista) o fragmento de unión al anticuerpo (tal
20 como un scFv) también para expresión en la superficie de la célula cancerosa, en particular donde las proteínas son expresadas como proteínas individuales en la superficie celular.

De este modo, en una modalidad el virus codifica
25 B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas

o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y un anticuerpo anti-VEGF (antagonista) o un fragmento de unión de la misma también para expresión en la superficie de la célula cancerosa o por liberación a partir de la célula cancerosa, por ejemplo, por secreción o después de la lisis/muerte de la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando de proteína que se une a CD3, CD28, CD80, CD86, 4-1BB, GITR, OX40, CD27, CD40 también para expresión en la superficie de la célula cancerosa o por liberación a partir de la célula cancerosa, por ejemplo, por secreción o liberación después de la lisis/muerte de la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y una citocina seleccionada a partir de IL-2, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, GM-CSF, IL-15, IL-12, y FLT3L, por ejemplo, por liberación a partir de la célula cancerosa, en particular por secreción o liberación después de la lisis/muerte celular de la célula

cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la
5 superficie de la célula cancerosa infectada y una quimiocina seleccionada a partir de MIP1-alfa, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, por ejemplo, por liberación a partir de la célula cancerosa, en particular por secreción o liberación después
10 de la lisis/muerte celular de la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y un anticuerpo
15 anti-CD3 (agonista) o fragmento de unión al anticuerpo (tal como un scFv) también para expresión en la superficie de la célula cancerosa (en particular donde las proteínas son expresadas como proteínas individuales en la superficie celular) y además codifica una citocina o quimiocina
20 seleccionada a partir de IL-2, IFN-alfa, IFN-gamma, GM-CSF, IL-15, IL-12, FLT3L, MIP1-alfa, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21 por ejemplo, por liberación a partir de la célula cancerosa, en particular por secreción o después de la
25 lisis/muerte celular de la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y un anticuerpo anti-CD3 (agonista) o fragmento de anticuerpo (tal como un scFv) también para expresión en la superficie de la célula cancerosa (en particular donde las proteínas son expresadas como proteínas individuales en la superficie celular) y además codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando de proteína que se une a CD28, CD80, CD86, 4-1BB, GITR, OX40, CD27, CD40 o un anticuerpo anti-VEGF (antagonista) también para expresión en la superficie de la célula cancerosa o por liberación a partir de la célula cancerosa, por ejemplo, por secreción o liberación después de la lisis/muerte de la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y dos citocinas o quimiocinas diferentes seleccionadas a partir de IL-2, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\gamma$, GM-CSF, IL-15, y IL-12, FLT3L, $MIP1\alpha$, IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, por ejemplo, por liberación a partir de la célula cancerosa, en particular por secreción de después de la lisis/muerte celular de la célula cancerosa infectada.

De este modo, en una modalidad el virus codifica B7-1, B7-2 o un fragmento activo de cualquiera de las mismas o una combinación de las mismas para expresión en la superficie de la célula cancerosa infectada y un anticuerpo anti-CD3 (agonista) o fragmento de unión al anticuerpo (tal como un scFv) también para expresión en la superficie de la célula cancerosa (en particular donde las proteínas son expresadas como proteínas individuales en la superficie celular) y además codifica una citocina independientemente seleccionada a partir de IL-2, $IFN\alpha$, $IFN\gamma$, GM-CSF, IL-15, y IL-12, y o una quimiocina seleccionada a partir de isoformas RANTES (CCL5), $MIP1\alpha$ (LD78a (CCL3) o LD78P (CCL3L1)), $MIP1\beta$ el cual puede ser liberado a partir de la célula cancerosa, en particular por secreción antes y liberación después de la lisis/muerte celular de la célula cancerosa infectada.

En una modalidad la cual en particular puede ser combinada con cualquiera de las modalidades anteriores el virus además codifica un anticuerpo anti-PD-1 (un antagonista).

En una modalidad la proteína o proteínas codificadas en el casete del transgen para la expresión de la membrana celular también puede comprender un enlazador o espaciador peptídico entre el dominio de la transmembrana y el dominio de unión del ligando extracelular. Tales enlazadores o espaciadores pueden agregar flexibilidad a la

proteína expresada en la superficie celular que mejora la capacidad de la proteína para interactuar con su molécula objetivo, por ejemplo, en una célula adyacente. Tales enlazadores o espaciadores pueden también ser diseñados o
5 seleccionados para promover la dimerización o trimerización de las proteínas en la superficie celular, mediante formación de enlace disulfuro o interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, las regiones bisagra de moléculas de inmunoglobulina o CD8 pueden ser empleadas para mejorar tanto flexibilidad
10 como dimerización.

En una modalidad la proteína o proteínas codificadas en el casete del transgen también puede comprender una etiqueta peptídica. La etiqueta peptídica puede incluir etiquetas c-myc, poly-histidina, V5 o FLAG y
15 puede ser localizada en el N-término o C-término del polipéptido, ya sea intracelularmente o extracelularmente, o puede ser codificada dentro de la proteína, por ejemplo, en un bucle extracelular o entre el dominio de la transmembrana y el dominio extracelular. Las etiquetas peptídicas pueden
20 ser usadas como espaciadores o enlazadores entre diferentes dominios de proteína, por ejemplo, la transmembrana y el dominio extracelular, y pueden ser usadas para detección o purificación o detección de la proteína, o células que expresan la proteína.

25 En una modalidad uno o más transgenes adicionales

(distintos del gene que codifica la proteína B7 o fragmento de la misma) está bajo el control de un promotor exógeno o endógeno, por ejemplo, un promotor endógeno. En una modalidad un transgen en la región E3 (B2) está bajo el control de un
5 promotor exógeno.

En una modalidad uno o más genes de transgenes adicionales están entre la región E3 y la fibra L5 en el genoma del adenovirus, por ejemplo, en una posición B_x en el constructo de fórmula (I), en particular bajo el control de
10 un promotor exógeno, de este modo, en una modalidad un transgen en B_x está bajo el control de un exógeno.

En una modalidad uno o más genes de transgenes adicionales están entre la región E4 y la fibra L5 en el genoma del adenovirus, por ejemplo, en una posición B_y en el
15 constructo de fórmula (I) o (Ia), en particular bajo el control de un promotor endógeno, tal como el promotor tardío mayor. Esto puede ser en adición a la proteína B7 o fragmento activo de la misma codificada en la región B_y .

En una modalidad se proporciona una composición que
20 comprende un adenovirus oncolítico de conformidad con la presente descripción, por ejemplo, una composición farmacéutica, en particular que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente o portador.

25 En una modalidad se proporciona un adenovirus

oncolítico de conformidad con la presente descripción o una composición que comprende el mismo, para uso en el tratamiento, en particular para uso en el tratamiento de cáncer.

5 En una modalidad se proporciona un método para tratar un paciente en necesidad del mismo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus oncolítico de conformidad con la presente descripción o una composición, tal como una composición farmacéutica que
10 comprende la misma.

 En una modalidad se proporciona el uso de un adenovirus oncolítico de conformidad con la presente descripción o una composición que comprende la misma para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer,
15 en particular carcinomas, por ejemplo, cáncer colorrectal, pulmonar, vejiga, renal, pancreático, hepático, cabeza y cuello, mama u ovario.

 En una modalidad se proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia genómica de al menos 50% de un
20 virus de conformidad con la presente descripción (por ejemplo, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%) y que comprende una secuencia que codifica una proteína B7 o un fragmento activo de la misma, por ejemplo, una proteína B7 descrita en la presente, tal
25 como B7-1 o un fragmento activo de la misma. En una modalidad

la secuencia de polinucleótido está en la forma de un plásmido.

En una modalidad se proporciona una célula hospedera, por ejemplo, una célula de mamífero, tal como una
5 célula HEK293 o un derivado de la misma, que comprende un virus oncolítico de conformidad con la presente descripción o una secuencia de polinucleótido de conformidad con la presente descripción.

En una modalidad se proporciona un proceso para
10 preparar un adenovirus oncolítico de conformidad con la presente descripción que comprende una etapa de insertar un polinucleótido que codifica la proteína B7 o un fragmento activo de la misma en un adenovirus oncolítico.

En una modalidad se proporciona un proceso para
15 replicar un virus de conformidad con la presente descripción que comprende la etapa de cultivar células hospederas en la presencia del virus bajo condiciones adecuadas para replicación. En general el método comprenderá una etapa adicional de recolectar el virus, por ejemplo, a partir del
20 sobrenadante o después de la lisis de las células hospederas.

Definiciones

El virus oncolítico con selectividad para células cancerosas como se emplea en la presente se refiere a un virus elimina preferiblemente células cancerosas, por
25 ejemplo, debido a que infectan preferiblemente células

cancerosas y/o el ciclo de vida del virus es independiente del gen, tal como p53 que es disregulado, por ejemplo, sobre-expresado en células cancerosas. En una modalidad los virus oncolíticos infectan preferiblemente células cancerosas y
5 continúan replicándose en su genoma y produciendo proteínas cápsides para generar nuevas partículas de virus, por ejemplo, como por EnAd.

La selectividad para células cancerosas (índice terapéutico) puede ser probada como se describe en el
10 documento W02005/118825 incorporado en la presente por referencia.

El transgen como se emplea en la presente se refiere a un gen que ha sido insertado en la secuencia del genoma del adenovirus, en donde el gen es no natural al virus
15 (exógeno) o no encontrado normalmente en tal ubicación particular en el virus. Ejemplos de transgenes se proporcionan en la presente. El transgen como se emplea en la presente también incluye un fragmento funcional del gen que es una porción del gen el cual cuando es insertado es
20 adecuado para realizar la función o la mayoría de la función del gen de longitud completa, por ejemplo, 50% de la función o más.

El transgen y secuencia codificante son usados intercambiabilmente en la presente en el contexto de insertos
25 en el genoma viral, a menos que el contexto lo indique de

otro modo. La secuencia codificante como se emplea en la presente significa, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína. Típicamente, la secuencia codificante es cADN para el
5 transgen que codifica el ARN funcional, péptido, polipéptido o proteína de interés. El ARN funcional, péptidos, polipéptidos y proteínas de interés se describen en abajo.

En una modalidad el transgen como se emplea en la presente se refiere a un segmento de ADN que contiene un gen
10 o una secuencia de ADN que ha sido aislada a partir de un organismo y es introducida en un organismo diferente, es decir, el virus de la presente descripción. En una modalidad este segmento no nativo de ADN en general, retendrá la capacidad para producir ARN funcional, péptido, polipéptido o
15 proteína. Los transgenes empleados pueden, por ejemplo, codificar proteínas únicas o fragmento activo de la misma, proteína quimérica o una proteína de fusión.

Claramente, el genoma del virus contiene secuencias codificantes de ADN. Endógenas (genes que se originan
20 naturalmente) en la secuencia genómica del virus no es considerada un transgen, dentro del contexto de la presente especificación a menos que hayan sido modificadas por técnicas recombinantes tales como las que existen en una ubicación no natural o en un ambiente no natural.

25 De este modo, en una modalidad el transgen

insertado codifica una proteína, polipéptido o péptido humanos o humanizados.

En una modalidad el transgen comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína B7 o un fragmento
5 activo de la misma. La presente descripción proporciona que la proteína B7 o fragmento activo de la misma pueda ser proporcionada en uno o más formatos independientemente seleccionada a partir de una proteína de fusión, una proteína B7 simple o un fragmento activo de la misma.

10 La proteína B7 simple o un fragmento activo de la misma como se emplea en la presente se refiere a proteínas las cuales son esencialmente proteínas de tipo silvestre, por ejemplo, las cuales no son parte de una proteína de fusión y las cuales tiene una secuencia idéntica o similar a la
15 proteína conocida relevante, en particular, la proteína humana conocida. El gen simple también incluye en donde 10% de los aminoácidos son sustituidos o suprimidos sobre la longitud completa de la proteína relevante.

El anclaje GPI como se emplea en la presente se
20 refiere a un glicolípido que puede ser unido al C-término de una proteína durante la modificación post-traducciona. Está compuesto de un grupo de fosfatidilinositol ligado a través de un enlazador que contiene carbohidrato (glucosamina y manosa unidos al residuo de inositol) y mediante un puente de
25 etanolamina fosfato (EtNP) al aminoácido C-terminal de una

proteína madura. Los dos ácidos grasos dentro del grupo fosfatidil-inositol hidrofóbico ancla la proteína a la membrana celular.

Las proteínas glipidadas (ligadas a GPI) en general, contienen un péptido señal, de este modo, dirigiéndolo en el retículo endoplásmico (ER). El C-término está compuesto de aminoácidos hidrofóbicos que permanece insertado en la membrana del ER. El extremo hidrofóbico es entonces escindido y reemplazado por el anclaje GPI. Conforme la proteína progresa a través de la trayectoria secretora, es transferida mediante vesículas al aparato de Golgi y finalmente al espacio extracelular donde permanece unido al foliolo exterior de la membrana celular. Puesto que la glipidación es el único medio de unión de tales proteínas a la membrana, la escisión del grupo por fosfolipasas resultará en la liberación controlada de la proteína a partir de la membrana. El último mecanismo es usado *in vitro*; es decir, las proteínas de la membrana liberadas de las membranas en el ensayo enzimático son proteínas glipidadas.

Las fosfolipasa C (PLC) es una enzima que se conoce por escindir la unión fosfo-glicerol encontrada en proteínas ancladas por GPI. El tratamiento con PLC causará liberación de las proteínas ligadas por GPI a partir de la membrana celular externa. El marcador de células T. El marcador de células T Thy-1 y acetil colinesterasa, así como también

tanto fosfatasa alcalinas intestinales como placentales, se conocen por estar ligadas a GPI y son liberadas por tratamiento con PLC. Las proteínas ligadas a GPI se piensa están siendo preferiblemente localizadas en cantidades
5 lípidas, sugiriendo un alto nivel de organización dentro de los microdominios de la membrana plasmática.

Un revisión del anclaje de GPIs escrito por Ferguson, Kinoshita y Hart está disponible en el Capítulo 11 de Essentials of Glycobiology 2nd Edición.

10 Virus

La replicación competente en el contexto de la presente especificación se refiere a un virus que posee toda la maquinaria necesaria para replicarse en las células *in vitro* e *in vivo*, es decir, sin la asistencia de una línea de
15 células de empaque. Un vector viral, por ejemplo, suprimido en al menos la región E1A, capaz de replicarse en una línea de células de empaque complementaria no es un virus de replicación competente en el presente contexto.

Un vector viral es un virus deficiente de
20 replicación, el cual requiere una línea de células de empaque (que comprende un transgen) para replicarse.

Un virus capaz de replicación como se emplea en la presente se refiere a un virus de replicación competente o un virus cuya replicación es dependiente de un factor en las
25 células cancerosas, por ejemplo, un factor regulado

ascendentemente, tal como p53 o similar.

En una modalidad el adenovirus es un adenovirus humano, "adenovirus", "serotipo" o "serotipo adenoviral" como se emplean en la presente se refiere a cualquier adenovirus que puede ser asignado a cualquiera de los más de 50 serotipos adenovirales actualmente conocidos, los cuales son clasificados en subgrupos A-F, y además se extienden a cualquiera, como serotipos adenovirales aún no clasificados o no identificados. Véase, por ejemplo, Strauss, "Adenovirus infections in humans," en The adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984) y Shenk, "Adenoviridae: E1 viruses and Their Replication," en Fields Virology, Vol.2, Cuarta Edición, Knipe, 35ea., Lippincott Williams and Wilkins, pp. 2265-2267 (2001), como se muestra en la Tabla 1.

SubGrupo	Serotipo Adenoviral
A	12, 18, 31
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 51
C	1, 2, 5, 6
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-
E	4
F	40, 41

Los adenovirus son agrupados con base en su cápside.

En una modalidad el adenovirus es un subgrupo B, por ejemplo, seleccionado independientemente a partir del

grupo que comprende o que consiste de: Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34 y Ad51, tal como Ad11, en particular Ad11p (la cepa Slobitski). En una modalidad el adenovirus de la invención tiene el cápside, tal como el hexón y/o fibra de un subgrupo de adenovirus B, tal como Ad11, en particular Ad11p. En una modalidad el adenovirus es Ad11 o tiene la fibra y/o hexón y/o pentón de Ad11, tal como Ad11p.

En una modalidad el virus de la presente descripción no es un virus del grupo A.

En una modalidad el virus de la presente descripción no comprende una proteína de muerte adeno (ADP).

En una modalidad el virus de la presente descripción no es un grupo del virus C.

En una modalidad el virus de la presente descripción no comprende más y un fragmento de parte de un virus Ad5.

El Enadenotucirev (EnAd) es un adenovirus oncolítico quimérico, anteriormente conocido como ColoAd1 (documento W02005/118825), con fibra, pentón y hexón de Ad11p, por lo tanto, es un virus del subgrupo B. Tiene una región E2B quimérica, la cual comprende ADN de Ad11p y Ad3. Casi toda la región E3 y parte de la región E4 es suprimida en EnAd. Por lo tanto, tiene espacio significativo en el genoma para acomodar material genético adicional mientras permanece viable. Además, debido a que el EnAd es un subgrupo

de adenovirus B, la inmunidad pre-existente en humanos es menos común que, por ejemplo, Ad5. Otros ejemplos de virus oncolíticos quiméricos con fibra, pentón y hexón de Ad11 incluyen OvAd1 y OvAd2 (véase documento W02006/060314).

5 El EnAd parece infectar preferiblemente células tumorales, se replica rápidamente en estas células y causa lisis celular. De este modo, a su vez, puede generar las respuestas inmunes inflamatorias de este modo estimulando el cuerpo para también luchar contra el cáncer. Parte del éxito
10 de EnAd se supone que está relacionado con la rápida replicación del virus *in vivo*.

De manera importante, se ha demostrado clínicamente que el EnAd puede ser administrado sistémicamente (por ejemplo, por inyección o infusión intravenosa o
15 intraperitoneal) y después infectar subsecuentemente de manera selectiva y expresar proteínas dentro de células tumorales. Esta propiedad de EnAd, la cual puede ser compartida por Ad11p y otros adenovirus del grupo B en particular aquellos que expresan las proteínas cápsides de
20 Ad11p (tales como aquellas descritas en la presente), hace posible expresar proteínas en la superficie de células cancerosas sin tener que inyectar directamente los transgenes en el tumor, lo cual no es factible para muchos cánceres.

Mientras el EnAd lisa selectivamente células
25 tumorales, puede ser posible introducir propiedades benéficas

adicionales, por ejemplo, incrementar la actividad terapéutica del virus o reducir los efectos secundarios del virus armándolo con transgenes, tal como un transgen el cual codifica una proteína de señalización celular o un anticuerpo, o un transgen el cual codifica una entidad la cual estimula una proteína(s) de señalización celular.

Ventajosamente armar un virus, con ADN que codifica ciertas proteínas que pueden ser expresadas dentro de la célula cancerosa, puede permitir a las defensas propias del cuerpo ser empleadas para combatir células tumorales más efectivamente, por ejemplo, haciendo a las células más visibles al sistema humano o suministrando un gen/proteína terapéutico preferiblemente a las células tumorales objetivo.

En una modalidad el adenovirus oncolítico de la presente descripción estimula el sistema inmune del paciente para luchar contra el tumor, por ejemplo, reduciendo la capacidad de los cánceres para suprimir las respuestas inmunes.

En una modalidad los virus oncolíticos tienen proteínas de fibra, hexón y pentón a partir del mismo serotipo, por ejemplo, Ad11, en particular Ad11p, por ejemplo, encontrado en las posiciones 30812-31789, 18254-21100 y 13682-15367 de la secuencia genómica del último en donde las posiciones de nucleótido son relativas al Genbank ID 217307399 (número de acceso: GC689208).

En una modalidad el adenovirus es enadenotucirev (también conocido como EnAd y anteriormente ColoAd1). El enadenotucirev como se emplea en la presente se refiere al adenovirus quimérico de la SEQ ID NO: 21. Es un adenovirus quimérico oncolítico de replicación competente el cual tiene propiedades terapéuticas mejoradas a los adenovirus de tipo silvestre (véase documento W02005/118825). El EnAd tiene una región E2B quimérica, la cual caracteriza el ADN de Ad11p y Ad3, y supresiones en E3/E4. Los cambios estructurales en enadenotucirev resultan en un genoma que es aproximadamente 3.5kb más pequeño que Ad11p de este modo proporcionando "espacio" adicional para la inserción de transgenes.

Las moléculas de anticuerpo como se emplean, pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene cadenas ligera y pesada de longitud completa, biespecíficas del formato de anticuerpo que comprenden anticuerpos de longitud completa o un fragmento de cualquiera de los mismos que incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, bi, anticuerpos tri o tetra-valentes, Bis-scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo, Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3), 209-217). Los métodos

para crear y manufacturar estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para uso en la presente
 5 invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de Patente Internacional W02005/003169, W02005/003170 y W02005/003171. Los anticuerpos multi-valentes pueden comprender especificidades múltiples, por ejemplo, biespecíficos o pueden ser monoespecíficos (véase, por
 10 ejemplo, documentos W0 92/22853, W005/113605, W02009/040562 y W02010/035012).

El anticuerpo como se emplea en la presente, a menos que el contexto lo indique de otro modo se refiere a un anticuerpo de longitud completa.

15 Los fragmentos de unión al anticuerpo se refieren a un fragmento que comprende dominios de unión los cuales, tales como una VH y/o VL las cuales retienen la especificidad para el antígeno objetivo al cual se une, y por ejemplo, Fab, Fab modificado, Fab', Fab' modificado, F(ab')₂, Fv, dominios
 20 de anticuerpo único (por ejemplo, VH o VL o VHH), scFv, anticuerpos bi, tri, o tetra-valentes, diacuerpos Bis-scFv, triacuerpos, tetracuerpos y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los mismos.

Enlazadores

25 Los enlazadores adecuados para uso en proteínas de

fusión de la presente descripción incluyen:

Tabla 2. Secuencias enlazadoras bisagra

SEQ ID NO:	SECUENCIA
26	DKTHTCAA
27	DKTHTCPPCPA
28	DKTHTCPPCPATCPPCPA
29	DKTHTCPPCPATCPPCPATCPPCPA
30	DKTHTCPPCPAGKPTLYNSLVMSDTAGTCY
31	DKTHTCPPCPAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY
32	DKTHTCCVECPCPA
33	DKTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPA
34	DKTHTCPSCPA

Tabla 3. Secuencias enlazadoras flexibles

SEQ ID NO:	SECUENCIA
35	SGGGGSE
36	DKHTS
37	(S)GGGGS
38	(S)GGGGSGGGGS
39	(S)GGGGSGGGSGGGGS
40	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGGS
41	(S)GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
42	AAAGSG-GASAS
43	AAAGSG-XGGGS-GASAS
44	AAAGSG-XGGGSXGGGS -GASAS
45	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGS -GASAS
46	AAAGSG- XGGGSXGGGSXGGGSXGGGS-GASAS
47	AAAGSG-XS-GASAS
48	PGGNRGTTTTTRRPATTTGSSPGPTQSHY
49	ATTTGSSPGPT
50	ATTTGS
-	GS
51	EPSPGISTINSPPSKESHKSP
52	GTVAAPSVFIFPPSD
53	GGGGIAPSMVGGGGS
54	GGGGKVEGAGGGGGS

5	55	GGGGSMKSHDGGGGS
	56	GGGGNLITIVGGGGS
	57	GGGGVVPSLPGGGGS
	58	GGEKSIPGGGGS
	59	RPLSYRPPFPFGFPSVRP
10	60	YPRSIYIRRRHPSPSLTT
	61	TPSHLSHILPSFGLPTFN
	62	RPVSPFTFPRLSNSWLPA
	63	SPA AHFPRSIPRPGPIRT
	64	APGPSAPSHRSLPSRAFG
	65	PRNSIHFLHPLLVA PLGA
	66	MPSLSGVLQVRYLSPPDL
	67	SPQYPSPLTLTLPPHPSL
	68	NPSLNPPSYLHRAPSRIS
	69	LPWRTSLLPSLPLRRRP
15	70	PPLFAKGPVGLLSRSFPP
	71	VPPAPVVSLRSAHARPPY
	72	LRPTPPRVRSYTCCPTP-
	73	PNVAHVLP LLTVPWDNLR
	74	CNPLLPLCARSPAVRTFP

15 (S) es opcional en las secuencias 37 a 41.

Ejemplos de enlazadores rígidos incluyen la secuencia peptídica GAPAPAAPAPA (SEQ ID NO: 75), PPPP (SEQ ID NO: 76) y PPP.

Otros enlazadores se muestran en la Tabla 4:

20

25

	SEQ ID NO:	SECUENCIA
	77	DLCLRDWGCLW
	78	DICLPRWGCLW
	79	MEDICLPRWGCLWGD
	80	QRLMEDICLPRWGCLWEDDE
5	81	QGLIGDICLPRWGCLWGRSV
	82	QGLIGDICLPRWGCLWGRSVK
	83	EDICLPRWGCLWEDD
	84	RLMEDICLPRWGCLWEDD
	85	MEDICLPRWGCLWEDD
	86	MEDICLPRWGCLWED
	87	RLMEDICLARWGCLWEDD
	88	EVRSFCTRWPAEKCKPLRG
10	89	RAPESFVCYWETICFERSEQ
	90	EMCYFPGICWM

Definiciones Relevantes a la Fórmula (I) y (Ia)

Un enlace se refiere a un enlace covalente que conecta una secuencia de ADN a otra secuencia de ADN, por ejemplo, que conecta una sección del genoma del virus a otra. De este modo, cuando una variable en la fórmula (I) y (Ia) de la presente representa un enlace, la característica o elemento representado por el enlace está ausente, es decir, suprimido.

Como la estructura de los adenovirus es, en general, similar a los elementos siguientes, son discutidas en términos de los elementos estructurales y la nomenclatura comúnmente usada con referencia a estos, los cuales son conocidos por la persona experta. Cuando un elemento es referido en la presente, entonces se refiere a la secuencia

de ADN que codifica el elemento o una secuencia de ADN que codifica la misma proteína estructural del elemento en un adenovirus. El último es relevante debido a la redundancia del código de ADN. La referencia de los virus para el empleo
5 del codón puede ser necesaria para ser considerado para resultados optimizados.

Cualquier elemento estructural de un adenovirus empleado en los virus de la presente descripción puede comprender o consistir de la secuencia natural o puede tener
10 similitud sobre la longitud dada de al menos 95%, tal como 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. La secuencia original puede ser modificada para omitir 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% del material genético. La persona experta está consciente de que cuando se hacen cambios a los marcos lectores de los
15 virus, no deben ser alterados de manera que la expresión de las proteínas estructurales se altera.

En una modalidad el elemento dado es una secuencia de longitud completa, es decir, el gen de longitud completa. El gen de longitud completa como se emplea en la presente se
20 refiere al menos a la totalidad de la secuencia codificante de un gen, pero puede incluir cualesquiera de las regiones no codificantes, especialmente si son relevantes a la función del gen.

En una modalidad el elemento dado es menor que una
25 longitud completa y retiene la misma o correspondiente

función como la secuencia de longitud completa.

En una modalidad para un elemento dado el cual es opcional en los constructos de la presente descripción, la secuencia de ADN puede ser menor de una longitud completa y
5 no tiene funcionalidad, por ejemplo, la región E3 puede ser totalmente o parcialmente suprimida. Sin embargo, puede ser útil suprimir esencialmente toda la región E3 ya que esta optimiza el espacio disponible para insertar transgenes.

Los genes estructurales que codifican proteínas
10 funcionales o estructurales del adenovirus están en general ligadas por regiones no codificantes de ADN. De este modo, existe alguna flexibilidad aproximadamente donde se "corta" la secuencia genómica del elemento estructural de interés (especialmente regiones no codificantes de las mismas) con el
15 propósito de insertar un transgen en los virus de la presente descripción. De este modo, para los propósitos de la presente especificación, el elemento será considerado un elemento estructural de referencia en la medida en que se fija para el propósito y no codifica el material extraño. De este modo, si
20 es apropiado, el gen se asociará con regiones no codificantes adecuadas, por ejemplo, como se encuentra en la estructura natural del virus.

De este modo, en una modalidad un inserto, tal como ADN que codifica un sitio de restricción y/o transgen, es
25 insertado en una región no codificante del ADN del virus

genómico, tal como una secuencia intergénica o intrón. Habiendo dicho esto, algunas regiones no codificantes del adenovirus pueden tener una función, por ejemplo, en empalmes alternativos, regulación de la transcripción o regulación de la transcripción, y esto puede necesitar ser tomado en consideración.

Los sitios identificados en la presente, que están asociados en la región L5, son adecuados para acomodar una variedad de secuencias de ADN que codifican entidades complejas tales como ARNi, citocinas, proteínas multiméricas o de cadena única, tales como anticuerpos.

El gen como se emplea en la presente se refiere a secuencias codificantes y algunas no codificantes asociadas entre estas, por ejemplo, intrones y exones asociados. En una modalidad un gene comprende o consiste de solamente componentes estructurales esenciales, por ejemplo, región codificante.

Abajo sigue una discusión que se refiere a elementos estructurales específicos de adenovirus.

Las secuencias de Repetición Terminal Invertida (ITR) son comunes a todos los adenovirus conocidos (así nombrados debido a su simetría) y son los orígenes de cromosoma viral de replicación. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad para formar una hairpina.

La 5'ITR como se emplea en la presente se refiere a

parte o toda de una ITR a partir del extremo 5' de un adenovirus, el cual retiene la función del ITR cuando se incorpora en un adenovirus en una ubicación apropiada. En una modalidad la 5'ITR comprende o consiste de la secuencia de
5 aproximadamente 1pb hasta 138pb de la SEQ ID NO: 21 o una secuencia 90, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a esta a lo largo de la longitud completa, en particular la secuencia que consiste desde aproximadamente 1pb hasta 138pb de la SEQ ID NO: 21.

10 La 3'ITR como se emplea en la presente se refiere a parte o toda de una ITR a partir del extremo 3' de un adenovirus el cual retiene la función del ITR cuando se incorpora en un adenovirus en una ubicación apropiada. En una modalidad la 3'ITR comprende o consiste de la secuencia de
15 aproximadamente 32189pb hasta 32326bp de la SEQ ID NO: 21 o una secuencia 90, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a esta a lo largo de la longitud completa, en particular la secuencia que consiste desde aproximadamente 32189pb hasta 32326bp de la SEQ ID NO: 21.

20 La B1 como se emplea en la presente se refiere a la secuencia de ADN que codifica: parte o toda de una E1A a partir de un adenovirus, parte o toda la región E1B de un adenovirus, e independientemente parte o toda la región E1A y E1B de un adenovirus.

25 Cuando la B1 es un enlace entonces las secuencias

E1A y E1B será omitido a partir del virus. En una modalidad B1 es un enlace y de este modo, el virus es un vector.

En una modalidad B1 comprende además un transgen. Se sabe en la técnica que la región E1 puede acomodar un
5 transgen el cual puede ser insertado en una forma disruptiva en la región E1 (es decir, en la "mitad" de la secuencia) o parte o toda la región E1 puede ser suprimida para proporcionar más espacio para acomodar material genético.

E1A como se emplea en la presente se refiere a la
10 secuencia de ADN que codifica parte o toda de una región de adenovirus E1A. La última aquí está refiriéndose al polipéptido/proteína E1A. Puede ser mutado de manera que la proteína codificada por el gen E1A tiene cambios de aminoácido conservador o no conservador (por ejemplo, 1, 2,
15 3, 4 o 5 cambios, adiciones y/o supresiones de aminoácido sobre la longitud completa) de manera que tiene: la misma función como el tipo silvestre (es decir, la proteína no mutada correspondiente); función incrementada en comparación con la proteína de tipo silvestre; función disminuida, tal
20 como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre; o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma como sea apropiado.

E1B como se emplea en la presente se refiere a la
25 secuencia de ADN que codifica parte o toda de una región de

adenovirus E1B (es decir, polipéptido o proteína), se puede mutar de manera que la proteína codificada por el gen/región E1B tienen cambios de aminoácido conservadores o no conservadores (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 cambios, adiciones y/o supresiones de aminoácido sobre la longitud completa) de manera que tiene: la misma función como el tipo silvestre (es decir, la proteína no mutada correspondiente); función incrementada en comparación con la proteína de tipo silvestre; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre; o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma como sea apropiado.

De este modo, B1 puede ser modificada o no modificad con relación a una región E1 de tipo silvestre, tal como una E1A y/o E1B de tipo silvestre. La persona experta puede identificar fácilmente si E1A y/o E1B están presentes o suprimidos o mutados (parte).

El tipo silvestre como se emplea en la presente se refiere a un adenovirus o una secuencia conocidos a partir de un adenovirus conocido. Un adenovirus conocido es uno que ha sido identificado y nombrado, con respecto de si la información de secuencia está disponible.

En una modalidad B1 tiene la secuencia de 139pb hasta 3932pb de la SEQ ID NO: 21.

B_A como se emplea en la presente se refiere a la

secuencia de ADN que codifica las regiones E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 que incluyen algunas secuencias no codificantes, como sea apropiado (en particular que corresponden a la secuencia natural a partir de un adenovirus). En general esta secuencia
5 no comprenderá un transgen. En una modalidad la secuencia es sustancialmente similar o idéntica a una secuencia contigua a partir de un adenovirus conocido, por ejemplo, un serotipo mostrado en la Tabla 1, en particular un virus del grupo B, por ejemplo, Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35,
10 Ad51 o una combinación de la misma, tal como Ad3, Ad11 o una combinación de los mismos. En una modalidad es E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 se refiere a que comprende estos elementos y otros elementos estructurales asociados con la región, por ejemplo, BA en general incluirá la secuencia que codifica la proteína
15 IV2a, por ejemplo, como sigue: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

En una modalidad la región E2B es quimérica. Es decir, comprende secuencias de ADN de dos o más diferentes serotipos adenovirales, por ejemplo, de Ad3 y Ad11, tales como Ad11p. En una modalidad la región E2B tiene la secuencia
20 de 5068pb hasta 10355pb de la SEQ ID NO: 21 o una secuencia 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a esta sobre la longitud completa.

En una modalidad el componente E2B en el componente B_A comprende la secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 22 (la
25 cual corresponde a la SEQ ID NO: 3 descrita en el documento

W02005/118825). En una modalidad B_A tiene la secuencia de 3933pb hasta 27184pb de la SEQ ID NO: 21.

E3 como se emplea en la presente se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o toda de una región E3 de adenovirus (es decir, proteína/polipéptido), puede ser mutada de manera que la proteína codificada por el gen E3 tiene cambios de aminoácido conservadores o no conservadores (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 cambios, supresiones y/o adiciones de aminoácido sobre la longitud completa), de manera que tiene la misma función como el tipo silvestre (la proteína no mutada correspondiente); función incrementada en comparación con la proteína de tipo silvestre; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma, como sea apropiado.

En una modalidad la región E3 es de un serotipo de adenovirus dado en la Tabla 1 o una combinación del mismo, en particular un serotipo del grupo B, por ejemplo, Ad3, Ad7, Ad11 (en particular Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 o una combinación de los mismos, tal como Ad3, Ad11 (en particular Ad11p) o una combinación de los mismos. En una modalidad la región E3 tiene una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 23.

En una modalidad la región E3 es parcialmente

suprimida, por ejemplo, es 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% suprimida.

En una modalidad B₂ es un enlace, en donde el ADN
5 que codifica la región E3 está ausente.

En una modalidad el ADN que codifica la región E3 puede ser reemplazada o interrumpida por un transgen. Como se emplea en la presente "región E3 reemplazada por un transgen como se emplea en la presente incluye parte o toda la región
10 E3 que es reemplazada con un transgen.

En una modalidad la región B₂ comprende la secuencia de 27185pb hasta 28165pb de la SEQ ID NO: 24.

En una modalidad B₂ consiste de la secuencia de 27185pb hasta 28165pb de la SEQ ID NO: 24.

15 B_x como se emplea en la presente se refiere a la secuencia de ADN en la cercanía del extremo 5' del gen L5 en B_B. En la cercanía de, o próximo al extremo 5' del gen L5 como se emplea en la presente se refiere a: adyacente (contiguo) al extremo 5' del gen L5 o una región no
20 codificante inherentemente asociada con este, es decir, colindante o contigua al extremo cebador 5' del gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada inherentemente junto con esta. Alternativamente, en la cercanía de, o próxima puede referirse a estar cercano al gen L5, de manera
25 que las secuencias existentes no codificantes entre la región

B_x y el extremo 5' del gen L5.

De este modo, en una modalidad B_x está unido directamente a una base de L5 la cual representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia codificante del gen L5.

5 De este modo, en una modalidad B_x está unida directamente a una base de L5 la cual representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia no codificante, o unida directamente a una región no codificante naturalmente asociada a con L5. Una región no codificante naturalmente
10 asociada a L5 como se emplea en la presente se refiere a parte de todas las regiones no codificantes las cuales son partes del gen L5 o contiguas junto con estas, pero no parte de otro gen.

En una modalidad B_x comprende la secuencia de la
15 SEQ ID NO: 24. Esta secuencia es una secuencia no codificante artificial en donde una secuencia de ADN, por ejemplo, que comprende un transgen (o casete del transgen), un sitio de restricción o una combinación de los mismos puede ser insertado en esta. Esta secuencia es ventajosa debido a que
20 actúa como un amortiguador en que permite alguna flexibilidad sobre la ubicación exacta del transgen mientras minimiza los efectos disruptivos en la estabilidad y viabilidad del virus.

El(los) inserto(s) pueden ocurrir en cualquier lado dentro de la SEQ ID NO: 24 a partir del extremo 5', el
25 extremo 3' o en cualquier punto entre el pb 1 hasta 201, por

ejemplo, entre los pares base $1/2$, $2/3$, $3/4$, $4/5$, $5/6$, $6/7$,
 $7/8$, $8/9$, $9/10$, $10/11$, $11/12$, $12/13$, $13/14$, $14/15$, $15/16$,
 $16/17$, $17/18$, $18/19$, $19/20$, $20/21$, $21/22$, $22/23$, $23/24$,
 $24/25$, $25/26$, $26/27$, $27/28$, $28/29$, $29/30$, $30/31$, $31/32$,
5 $32/33$, $33/34$, $34/35$, $35/36$, $36/37$, $37/38$, $38/39$, $39/40$,
 $40/41$, $41/42$, $42/43$, $43/44$, $44/45$, $45/46$, $46/47$, $47/48$,
 $48/49$, $49/50$, $50/51$, $51/52$, $52/53$, $53/54$, $54/55$, $55/56$,
 $56/57$, $57/58$, $58/59$, $59/60$, $60/61$, $61/62$, $62/63$, $63/64$,
 $64/65$, $65/66$, $66/67$, $67/68$, $68/69$, $69/70$, $70/71$, $71/72$,
10 $72/73$, $73/74$, $74/75$, $75/76$, $76/77$, $77/78$, $78/79$, $79/80$,
 $80/81$, $81/82$, $82/83$, $83/84$, $84/85$, $85/86$, $86/87$, $87/88$,
 $88/89$, $89/90$, $90/91$, $91/92$, $92/93$, $93/94$, $94/95$, $95/96$,
 $96/97$, $97/98$, $98/99$, $99/100$, $100/101$, $101/102$, $102/103$,
 $103/104$, $104/105$, $105/106$, $106/107$, $107/108$, $108/109$,
15 $109/110$, $110/111$, $111/112$, $112/113$, $113/114$, $114/115$,
 $115/116$, $116/117$, $117/118$, $118/119$, $119/120$, $120/121$,
 $121/122$, $122/123$, $123/124$, $124/125$, $125/126$, $126/127$,
 $127/128$, $128/129$, $129/130$, $130/131$, $131/132$, $132/133$,
 $133/134$, $134/135$, $135/136$, $136/137$, $137/138$, $138/139$,
20 $139/140$, $140/141$, $141/142$, $142/143$, $143/144$, $144/145$,
 $145/146$, $146/147$, $147/148$, $148/149$, $150/151$, $151/152$,
 $152/153$, $153/154$, $154/155$, $155/156$, $156/157$, $157/158$,
 $158/159$, $159/160$, $160/161$, $161/162$, $162/163$, $163/164$,
 $164/165$, $165/166$, $166/167$, $167/168$, $168/169$, $169/170$,
25 $170/171$, $171/172$, $172/173$, $173/174$, $174/175$, $175/176$,

176/177, 177/178, 178/179, 179/180, 180/181, 181/182,
 182/183, 183/184, 184/185, 185/186, 186/187, 187/188,
 189/190, 190/191, 191/192, 192/193, 193/194, 194/195,
 195/196, 196/197, 197/198, 198/199, 199/200 o 200/201.

5 En una modalidad B_x comprende la SEQ ID NO: 24 con una secuencia de ADN insertada entre el pb 27 y pb 28 o un lugar que corresponde a las posiciones 28192pb y 28193pb de la SEQ ID NO: 24.

10 En una modalidad B_x tiene la secuencia de 28166pb hasta 28366pb de la SEQ ID NO: 21. En una modalidad B_x es un enlace.

15 B_B como se emplea en la presente se refiere a la secuencia de ADN que codifica la región L5. Como se emplea en la presente la región L5 se refiere a la secuencia de ADN que contiene el gene que codifica la fibra polipéptido/proteína, como sea apropiado en el contexto. La región/gen de fibra codifica la fibra proteína la cual es un componente cápside mayor de adenovirus. La fibra funciona en el reconocimiento del receptor y contribuye a la capacidad del adenovirus para
 20 unirse selectivamente e infectar células.

25 En virus de la presente descripción la fibra puede ser a partir de cualquier serotipo de adenovirus y adenovirus los cuales son quiméricos como resultado de cambiar la fibra por uno de un serotipo diferente, también están contemplados con la presente descripción. En una modalidad la fibra es a

partir de un virus del grupo B, en particular Ad11, tal como Ad11p.

En una modalidad B_B tiene la secuencia de 28367pb hasta 29344pb de la SEQ ID NO: 21.

5 La secuencia de ADN con relación a B_Y como se emplea en la presente se refiere a la secuencia de ADN en la cercanía del extremo 3' del gen L5 de B_B . En la cercanía de o próximo al extremo 3' del gen L5 como se emplea en la presente se refiere a: adyacente (contiguo) al extremo 3' del
10 gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada con esta, es decir, colindante o contigua al extremo cebado al 3' del gen L5 o una región no codificante inherentemente asociada con esta (es decir, toda o parte de una secuencia no codificante endógena a L5). Alternativamente, en la cercanía
15 de o próxima a, puede referirse a estar cercano al gen L5, de manera que existen secuencias no codificantes entre la región B_Y y el extremo 3' del gen L5.

De este modo, en una modalidad B_Y está unido directamente a una base de L5 la cual representa el "extremo"
20 de una secuencia codificante.

De este modo, en una modalidad B_Y está unido directamente a una base de L5 la cual representa el "extremo" de una secuencia no codificante, o unida directamente a una región no codificante asociada directamente con L5.

25 Inherentemente y naturalmente son usados

intercambiabilmente en la presente. En una modalitat By
comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 25. Esta secuencia es
una secuencia no codificante en donde una secuencia de ADN,
por ejemplo, que comprende un transgen (o casete del
5 transgen), un sitio de restricción o una combinación de la
misma, puede ser insertada. Esta secuencia es ventajosa
debido a que actúa como un amortiguador en que permite alguna
flexibilidad en la ubicación exacta del transgen mientras
minimiza los efectos disruptivos en la estabilidad y
10 viabilidad del virus.

El(los) inserto(s) pueden ocurrir en cualquier lado
dentro de la SEQ ID NO: 22 del extremo 5', el extremo 3' o en
cualquier punto entre el pb 1 hasta 35, por ejemplo, entre
los pares base 1/2, 2/3, 3/4, 4/5, 5/6, 6/7, 7/8, 8/9, 9/10,
15 10/11, 11/12, 12/13, 13/14, 14/15, 15/16, 16/17, 17/18,
18/19, 19/20, 20/21, 21/22, 22/23, 23/24, 24/25, 25/26,
26/27, 27/28, 28/29, 29/30, 30/31, 31/32, 32/33, 33/34, o
34/35.

En una modalitat By comprende la SEQ ID NO: 25 con
20 una secuencia de ADN insertada entre las posiciones de pb 12
y 13 o un lugar que corresponde a 29356pb y 29357pb en la SEQ
ID NO: 21. En una modalitat el inserto es un inserto del
sitio de restricción. En una modalitat el inserto del sitio
de restricción comprende uno o dos sitios de restricción. En
25 una modalitat el sitio de restricción es un inserto del sitio

de restricción de 19pb que comprende 2 sitios de restricción. En una modalidad el inserto del sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 9pb que comprende 1 sitio de restricción. En una modalidad el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción y al menos un transgen, por ejemplo, uno o dos o tres transgenes, tal como uno o dos transgenes. En una modalidad el sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 19pb que comprende 2 sitios de restricción y al menos un transgen, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una modalidad el inserto del sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 9pb que comprende 1 sitio de restricción y al menos un transgen, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una modalidad dos sitios de restricción intercalan uno o más, tal como dos transgenes (por ejemplo, en un casete del transgen). En una modalidad cuando B_Y comprende dos sitios de restricción tales sitios de restricción son diferentes de entre sí.

En una modalidad tal uno o más sitios de restricción en B_Y no están ocurriendo naturalmente (tal como único) en el genoma particular del adenovirus en el cual han sido insertados.

En una modalidad tal uno o más sitios de restricción en B_Y son diferentes a otros sitios de restricción localizados en otro lado en el genoma del

adenovirus, por ejemplo, diferentes a los sitios de restricción que se originan naturalmente o sitios de restricción introducidos en otras partes del genoma, tal como B_x. De este modo, en una modalidad el sitio o sitios de
 5 restricción o permiten al ADN en la sección ser cortado específicamente.

En una modalidad B_y tiene la secuencia de 29345pb hasta 29379pb de la SEQ ID NO: 21. En una modalidad B_y es un enlace.

10 En una modalidad el inserto está después de pb 12 en la SEQ ID NO: 25.

En una modalidad el inserto está en la posición de aproximadamente 29356pb de la SEQ ID NO: 21.

En una modalidad el inserto es un casete del
 15 transgen que comprende uno o más transgenes, por ejemplo, 1, 2 o 3, tal como 1 o 2.

E4 como se emplea en la presente se refiere a la secuencia de ADN que codifica parte o toda de una región de adenovirus E4 (es decir, región de polipéptido/proteína), la
 20 cual puede ser mutada de manera que la proteína codificada por el gen E4 tiene cambios de aminoácido conservador o no conservador (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 cambios, adiciones y/o supresiones de aminoácido), y tiene la misma función como el tipo silvestre (la proteína no mutada correspondiente);
 25 función incrementada en comparación con la proteína de tipo

silvestre; función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre o tiene una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre o una combinación de la misma como sea apropiado.

5 En una modalidad la región E4 es parcialmente suprimida, por ejemplo, es 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% suprimida. En una modalidad la región E4 tiene la secuencia de 32188pb hasta 29380pb de la SEQ ID NO: 21.

10 En una modalidad E4 está presente excepto para la región E4orf4 la cual es suprimida. En una modalidad B₃ es un enlace, es decir, en donde E4 está ausente.

 En una modalidad B₃ tiene la secuencia que consiste desde 32188pb hasta 29380pb de la SEQ ID NO: 21.

15 Como se emplea en la presente los intervalos numéricos son inclusivos de los puntos finales.

 La persona experta apreciará que los elementos en las formulas de la presente, tal como formulas (I), (Ia) son contiguos y pueden incluir secuencias de ADN no codificantes, así como también los genes y secuencias de ADN codificantes (características estructurales) mencionadas en la presente. En una o más modalidades las fórmulas de la presente descripción están intentando describir una secuencia que se origina naturalmente en el genoma del adenovirus. En este
25 contexto estará claro para la persona experta que la fórmula

está refiriéndose a los elementos mayores que caracterizan la sección relevante del genoma y no se pretenden por ser una descripción exhaustiva del estiramiento genómico del ADN.

E1A, E1B, E3 y E4 como se emplea en la presente
5 cada uno se refiere independientemente al tipo silvestre y equivalentes de los mismos, formas mutadas o parcialmente suprimidas de cada región como se describe en la presente, en particular una secuencia de tipo silvestre a partir de un adenovirus conocido.

10 "Inserto" como se emplea en la presente se refiere a una secuencia de ADN que es incorporada en ya sea en el extremo 5', el extremo 3' o dentro de un segmento de referencia de secuencia de ADN dada de manera que interrumpe la secuencia de referencia. Una secuencia de referencia
15 empleada como un punto de referencia con relación a la cual el inserto está localizado. En el contexto de la presente descripción, inserto en general, ocurre dentro de ya sea la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25. Un inserto puede ser ya sea un inserto del sitio de restricción, un casete del transgen o
20 ambos. Cuando la secuencia es interrumpida, el virus todavía comprenderá la secuencia original, pero en general, será como dos fragmentos que intercalan el inserto.

En una modalidad el transgen o casete del transgen no comprende un transposón de inserción no desviado, tal como
25 un transposón TN7 o parte del mismo. Transposón Tn7 como se

emplea en la presente se refiere a un transposón de inserción no desviado como se describe en el documento W02008/080003.

En una modalidad el transgen o casete del transgen comprende además un elemento o secuencia reguladora.

5 **Otras Secuencias Reguladoras**

 "Regulador de la expresión del gen" (o regulador/elemento regulador) como se emplea en la presente se refiere a un elemento genético, tal como un promotor, potenciador o un aceptor de secuencia de empalme que juega un
10 papel en la expresión del gen, típicamente iniciando o mejorando la transcripción o traducción.

 "Secuencia aceptora de empalme", "aceptor de empalme" o "sitio de empalme" como se emplea en la presente se refiere a una secuencia reguladora determinante cuando una
15 molécula de mRNA será reconocida por ribonucleoproteínas nucleares pequeñas del complejo de espliceosoma. Una vez ensamblado la espliceosoma cataliza el empalme entre el sitio aceptor de empalme de la molécula de mRNA a un sitio donador de empalme corriente arriba produciendo una molécula de mRNA
20 madura que puede ser traducida para producir un polipéptido o proteína únicos.

 Secuencias aceptoras de empalme dimensionadas diferentes pueden ser empleadas en la presente invención y estas pueden ser descritas como aceptor de empalme corto
25 (pequeño), aceptor de empalme (medio) y aceptor de empalme

ramificado (grande).

SSA como se emplea en la presente se refiere a un
 aceptor de empalme corto, típicamente que comprende solo el
 sitio de empalme, por ejemplo, 4 pb. SA como se emplea en la
 5 presente se refiere a un aceptor de empalme, típicamente que
 comprende el aceptor de empalme corto y el tracto de
 piridimidina, por ejemplo, 16 pb. bSA como se emplea en la
 presente se refiere a un aceptor de empalme ramificado,
 típicamente que comprende el aceptor de empalme corto, tracto
 10 de polipirimidina y el punto de ramificación, por ejemplo, 26
 pb.

En una modalidad el aceptor de empalme empleado en
 los constructos de la descripción son CAGG o SEQ ID NO: 3 o
 4. En una modalidad el SSA tiene la secuencia de nucleótido
 15 de la SEQ ID NO: CAGG. En una modalidad la SA tiene la
 secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 23. En una modalidad
 la bSA tiene la secuencia de nucleótido de cagg. En una
 modalidad la secuencia aceptora de empalme se selecciona
 independientemente a partir del grupo que comprende:
 20 tgctaatactt cctttctctc ttcagg (SEQ ID NO: 4), tttctctctt cagg
 (SEQ ID NO: 3), y cagg.

En una modalidad el sitio de empalme es
 inmediatamente precedido (es decir, seguido en una dirección
 5' a 3') por una secuencia Kozak consenso que comprende
 25 CCACC. En una modalidad el sitio de empalme y la secuencia

Kozak son intercalados (separados) por hasta 100 o menos pb. En una modalidad la secuencia Kozak tiene la secuencia de nucleótido de CCACC.

Típicamente, cuando bajo el control de un promotor
 5 endógeno o exógeno (tal como un promotor endógeno), la secuencia codificante será inmediatamente precedida por una secuencia Kozak. El inicio de la región codificante está indicado por el codón de inicio (AUG), por ejemplo, está en el contexto de la secuencia (gcc)gccRcc**AUG**g [SEQ ID NO: 105]
 10 el comienzo del inicio de las secuencias codificantes está indicado por las bases en negritas. Una letra minúscula denota bases comunes en esta posición (las cuales pueden, sin embargo, varias) y las letras mayúsculas indican bases altamente conservadas, es decir, la secuencia 'AUGG' es
 15 constante o rara vez, si es alguna, cambia; 'R' indica que una purina (adenina o guanina) es usualmente observada en esta posición y la secuencia en paréntesis (gcc) es de significancia incierta. De este modo, en una modalidad el codón de inicio AUG es incorporado en una secuencia Kozak.

20 La secuencia de ADN de Entrada del Ribosoma Interno como se emplea en la presente se refiere a una secuencia de ADN que codifica una Secuencia de Entrada al Ribosoma Interno (IRES). IRES como se emplea en la presente significa una secuencia de nucleótido que permite el inicio de la
 25 traducción de una secuencia de ARN mensajero (mARN), que

incluye inicio que parte dentro de una secuencia de mARN. Esto es particularmente útil cuando el casete codifica el mARN policitrónico. Usando un IRES resulta en un mARN policitrónico que es traducido en proteínas individuales múltiples o péptidos. En una modalidad la secuencia de ADN de Entrada al Ribosoma Interno tiene la secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 6. En una modalidad un IRES particular es solamente usado una vez en el genoma. Esto puede tener beneficios con respecto a la estabilidad del genoma.

10 “Péptido 3A auto-escindible de alta eficiencia” o “péptido 2A” como se emplea en la presente se refiere a un péptido, el cual es eficientemente escindido después de la traducción. Los péptidos 2A adecuados incluyen P2A, F2A, E2A y T2A. Los presentes inventores han indicado que una vez que una secuencia de ADN específica que codifica un péptido 2A
15 dado es usada una vez, la misma secuencia de ADN específica no puede ser usada una segunda vez. Sin embargo, la redundancia en el código de ADN puede ser utilizada para generar una secuencia de ADN que es traducida en el mismo péptido 2A. Usar los péptidos 2A es particularmente útil
20 cuando el casete codifica el mARN policitrónico. Usar péptidos 2A resulta en una cadena de polipéptido única siendo traducida, la cual es modificada post-traducción para generar proteínas individuales múltiples o polipéptidos.

25 En una modalidad el péptido P2A codificado empleado

tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad el péptido F2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 8. En una modalidad el péptido E2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 9. En una modalidad el péptido T2A codificado empleado tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad un mARN o cada mARN codificado por el transgen es/están comprendido de una secuencia de señal de poliadenilación, tal como típicamente en el extremo de una secuencia de mARN, por ejemplo, como se muestra en la SEQ ID NO: 5. De este modo, en una modalidad el transgen o el casete del transgen comprende al menos una secuencia que codifica una secuencia de señal de poliadenilación.

"PolyA", "señal de poliadenilación" o "secuencia de poliadenilación" como se emplea en la presente significa una secuencia de ADN, que contiene usualmente un sitio AATAAA, que una vez transcrito puede ser reconocido por un complejo de multiproteína que escinde y somete a poliadenilación la molécula de mARN naciente.

En una modalidad la secuencia de poliadenilación tiene la secuencia de nucleótido de la **SEQ ID NO: 5**.

En una modalidad el constructo no incluye una secuencia de poliadenilación. En una modalidad el regulador de la expresión del gen es un aceptor de secuencia de

empalme.

En una modalidad la secuencia que codifica una proteína/polipéptido/péptido, tal como un anticuerpo o fragmento de unión al anticuerpo comprende además una señal
5 de poliadenilación.

En una modalidad se proporciona un virus o constructo con una secuencia descrita en la presente, por ejemplo, un virus seleccionado de NG-330 (**SEQ ID NO: 16**); NG-334 (**SEQ ID NO: 17**); NG-345 (**SEQ ID NO: 18**); NG-346 (**SEQ ID**
10 **NO: 19**); NG-347 (**SEQ ID NO: 20**) y NG-348 (**SEQ ID NO: 96**).

En una modalidad el virus es NG-347 (**SEQ ID NO: 20**) o NG-348 (**SEQ ID NO: 96**).

Formulaciones

La presente descripción relates también se extiende
15 a una formulación farmacéutica de un virus como se describe en la presente.

En una modalidad se proporciona una formulación parenteral líquida, por ejempló, para infusión o inyección, de un oncolítico capaz de replicación de conformidad con la
20 presente descripción en donde la formulación proporciona una dosis en el intervalo de 1×10^{10} hasta 1×10^{14} partículas virales por volumen de dosis.

Formulación parenteral significa una formulación diseñada para no ser suministrada a través del tracto GI. Las
25 rutas de suministro parental típicas incluyen inyección,

implante o infusión. En una modalidad se proporciona la formulación en una forma para suministro de bolo.

En una modalidad la formulación parenteral está en la forma de una inyección. Inyección incluye inyección
5 intravenosa, subcutánea, intra-tumoral o intramuscular. La inyección como se emplea en la presente significa la inserción del líquido en el cuerpo mediante una jeringa. En una modalidad el método de la presente descripción no involucra una inyección intra-tumoral.

10 En una modalidad la formulación parenteral está en la forma de una infusión.

Infusión como se emplea en la presente significa la administración de fluidos a una velocidad inferior por goteo, bomba de infusión, controlador de jeringa o dispositivo
15 equivalente. En una modalidad la infusión es administrada durante un periodo en el intervalo de 1.5 minutos hasta 120 minutos, tal como aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 o 115
20 minutes.

En una modalidad una dosis de la formulación de menos de 100 mls, por ejemplo, 30mls, tal como administrada por un controlador de jeringa.

En una modalidad la inyección se administra como
25 una inyección lenta, por ejemplo, durante un periodo de 1.5

hasta 30 minutos.

En una modalidad la formulación es para administración intravenosa (i.v.). Esta ruta es particularmente efectiva para suministro del virus oncolítico
5 debido a que permite el rápido acceso a la mayoría de los órganos y tejidos, y es particularmente útil para el tratamiento de metástasis, por ejemplo, metástasis establecida especialmente aquellas localizadas en regiones altamente vascularizadas, tal como el hígado y pulmones.

10 Las formulaciones terapéuticas típicamente serán estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenaje. La composición puede ser formulada como una solución, microemulsión, liposoma, u otra formulación parenteral adecuada para administración a un humano y puede
15 ser formulada como un dispositivo pre-llenado tal como una jeringa o vial, particular como una dosis única.

La formulación en general comprenderá un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un portador isotónico no tóxico, que es compatible con el virus,
20 y en el cual el virus es estable por el periodo de tiempo requisito.

El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol
25 líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La

fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un dispersante o tensoactivo tal como lecitina o un tensoactivo no iónico tal como polisorbato 80 o 40. En dispersiones, el mantenimiento del tamaño de partícula
5 requerido puede ser asistido por la presencia de un tensoactivo. Ejemplos de agentes isotónicos incluyen azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

En una modalidad las formulaciones parenterales
10 empleadas pueden comprender uno o más de los siguientes amortiguadores, por ejemplo, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico, un amortiguador de fosfato y/o un amortiguador de Tris, un azúcar, por ejemplo, dextrosa, manosa, sacarosa o similares, una sal tal como cloruro de
15 sodio, cloruro de magnesio o cloruro de potasio, un detergente tal como un tensoactivo no iónico tal como brij, PS-80, PS-40 o similares. La formulación también puede comprender un preservativo tal como EDTA o etanol o una combinación de EDTA y etanol, las cuales se piensa previenen
20 una o más trayectorias de degradación posible.

En una modalidad la formulación comprenderá virus oncolítico purificado de conformidad con la presente descripción, por ejemplo, partículas virales 1×10^{10} hasta 1×10^{14} partículas virales por dosis, tal como 1×10^{10} hasta
25 1×10^{12} partículas virales por dosis. En una modalidad la

concentración del virus en la formulación está en el intervalo de 2×10^8 hasta 2×10^{14} vp/ml, tal como 2×10^{12} vp/ml.

En una modalidad la formulación parenteral comprende glicerol.

5 En una modalidad la formulación comprende adenovirus oncolíticos como se describe en la presente, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico), glicerol y amortiguador.

10 En una modalidad la formulación parenteral consiste del virus de la descripción, HEPES, por ejemplo, 5mM, glicerol, por ejemplo, 5-20% (v/v), ácido clorhídrico, por ejemplo, para ajustar el pH en el intervalo de 7-8 y agua para inyección.

15 En una modalidad 0.7 mL del virus de la descripción a una concentración de 2×10^{12} vp/mL es formulado en 5 mM de HEPES, 20% de glicerol con un pH final de 7.8.

Una discusión completa de portadores farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

20 En una modalidad la formulación es proporcionada como una formulación para administraciones tópicas que incluyen, inhalación.

25 Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles medidores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases

propulsores. Los polvos inhalables de conformidad con la descripción en general, contendrán un virus como se describe en la presente con un excipiente fisiológicamente aceptable.

Estos polvos inhalables pueden incluir
5 monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos
(por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligo- y
polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por
ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo,
cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos con
10 otros. Los mono- o disacáridos son adecuadamente usados,
tales como lactosa o glucosa, particularmente pero no
exclusivamente en la forma de sus hidratos.

Las partículas para deposición en el pulmón
requieren un tamaño de partícula de menos de 10 micras, tal
15 como 1-9 micras, por ejemplo, desde 0.1 hasta 5 μm , en
particular desde 1 hasta 5 μm . El tamaño de la partícula que
lleva el virus es de importancia primaria y de este modo, en
una modalidad el virus de conformidad con la presente
descripción puede ser adsorbido o absorbido sobre una
20 partícula, tal como una partícula de lactosa del tamaño dado.

Los gases propulsores los cuales pueden ser usados
para preparar los aerosoles inhalables se conocen en la
técnica. Los gases propulsores adecuados son seleccionados de
entre hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o
25 isobutano y halohidrocarburos tales como derivados clorados

y/o fluorados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente pueden ser usados por su cuenta o en mezclas de los mismos.

5 Gases propulsores particularmente adecuados en derivados de alcano halogenados seleccionados a partir de entre TG11, TG12, TG134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) y TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano)
10 y mezclas de los mismos, son particularmente adecuados.

 Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor también pueden contener otros ingredientes, tales como co-solventes, estabilizadores, agentes activos de la superficie (tensoactivos), antioxidantes, lubricantes y
15 medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes se conocen en la técnica.

 Los aerosoles inhalables que contienen gas propulsor de conformidad con la invención pueden contener hasta 5% en peso de sustancia activa. Los aerosoles de
20 conformidad con la invención contienen, por ejemplo, 0.002 hasta 5 %en peso, 0.01 hasta 3 % en peso, 0.015 hasta 2 % en peso, 0.1 hasta 2 % en peso, 0.5 hasta 2 % en peso o 0.5 hasta 1 % en peso de ingrediente activo.

 Alternativamente, las administraciones tópicas al
25 pulmón también pueden ser por administración de una solución

líquida o formulación de suspensión, por ejemplo, empleando un dispositivo tal como un nebulizador, por ejemplo, un nebulizador conectado a un compresor (por ejemplo, el nebulizador Pari LC-Jet Plus (R) conectado a un compresor
5 Pari Master(R) manufacturado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

El virus de la invención puede ser suministrado dispersado en un solvente, por ejemplo, en la forma de una solución o una suspensión, por ejemplo, como ya se describe
10 anteriormente para formulaciones parenterales. Puede ser suspendido en una solución fisiológica apropiada, por ejemplo, salina u otro solvente farmacológicamente aceptable o una solución amortiguada. Las soluciones amortiguadas conocidas en la técnica pueden contener 0.05 mg hasta 0.15 mg
15 de edetato disódico, 8.0 mg hasta 9.0 mg de NaCl, 0.15 mg hasta 0.25 mg de polisorbato, 0.25 mg hasta 0.30 mg de ácido cítrico anhidro, y 0.45 mg hasta 0.55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua, para así lograr un pH de aproximadamente 4.0 hasta 5.0.

20 Las formulaciones de solución o suspensiones terapéuticas también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes son bien conocidos en la técnica e incluyen amortiguadores (por ejemplo, amortiguador de citrato, amortiguador de fosfato, amortiguador de acetato y
25 amortiguador de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes,

ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina en suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol, y glicerol. Las soluciones o suspensiones pueden ser encapsuladas en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación en general, será proporcionada en una forma sustancialmente estéril empleando procesos de manufactura estéril.

Esto puede incluir producción y esterilización por filtración del solvente/solución amortiguada usada para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de solvente amortiguado estéril y dispensión de la formulación en receptáculos estériles por métodos familiares por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica.

La formulación nebulizable de conformidad con la presente descripción puede ser proporcionada, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, contenedores de plástico sellados o viales) envasadas en envolturas de aluminio. Cada vial contiene una dosis unitaria en volumen, por ejemplo, 2 mL, de solvente/amortiguador de solución.

La presente descripción también se extiende a soluciones líquidas o suspensiones suministradas intranasalmente, por ejemplo, empleando un dispositivo como se describe en los documentos W02009/068877 y US2004/0153033 ambos incorporados en la presente por referencia.

Tratamiento

En un aspecto adicional la presente descripción se extiende a un virus o una formulación de la misma como se describe en la presente para uso en el tratamiento, en particular para el tratamiento de cáncer.

En una modalidad el método de tratamiento es para uso en el tratamiento de un tumor.

Tumor como se emplea en la presente está propuesto para referirse a una masa anormal de tejido que resulta de la división celular excesiva que es no controlada y progresiva, también llamada un neoplasma. Los tumores pueden ser ya sea benignos (no cancerosos) o malignos. Los tumores abarcan todas las formas de cáncer y metástasis. En una modalidad el tumor es canceroso.

En una modalidad el tumor es un tumor sólido. El tumor sólido puede ser localizado o metastatizado.

En una modalidad el tumor es de origen epitelial.

En una modalidad el tumor es una enfermedad maligna, tal como cáncer colorrectal, hepatoma, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer tiroideo, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de pulmón.

En una modalidad el tumor es una enfermedad maligna colorrectal.

Enfermedad maligna como se emplea en la presente se

refiere a células cancerosas.

En una modalidad el adenovirus oncolítico es empleado en el tratamiento o prevención de metástasis.

En una modalidad el método o formulación de la presente es empleado en el tratamiento de cánceres resistentes a fármacos.

En una modalidad el virus es administrado en combinación con la administración de un tratamiento o terapia para cáncer adicional.

En una modalidad se proporciona un virus o formulación de conformidad con la presente descripción para uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer, por ejemplo, un cáncer descrito anteriormente.

En un aspecto adicional, se proporciona un método para tratar cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus o formulación de conformidad con la presente descripción a un paciente en necesidad del mismo, por ejemplo, un paciente humano.

En una modalidad el virus oncolítico o formulación de la presente es administrado en combinación con otra terapia.

“En combinación” como se emplea en la presente está propuesto para abarcar donde el virus oncolítico es administrado antes, concurrentemente y/o post-tratamiento o terapia para el cáncer. Sin embargo, en general los regímenes

de combinación para la terapia de combinación para el cáncer

La terapia de cáncer incluye cirugía, terapia por radiación, terapia dirigida y/o quimioterapia.

Tratamiento para cáncer como se emplea en la presente se refiere a tratamiento con un compuesto terapéutico o agente biológico, por ejemplo, un anticuerpo propuesto para tratar el cáncer y/o terapia de mantenimiento del mismo.

En una modalidad el tratamiento para el cáncer es seleccionado a partir de cualquiera de otra terapia anticancerígena que incluye un agente quimioterapéutico; un agente anti-cancerígeno dirigido, tal como un conjugado de fármaco de anticuerpo; radioterapia, terapia con radioisótopo o cualquier combinación de los mismos.

En una modalidad el virus de la presente descripción tal como un adenovirus oncolítico puede ser usado como un pre-tratamiento a la terapia, tal como una cirugía (terapia neoadyuvante), para encoger el tumor, para tratar metástasis y/o prevenir la metástasis o metástasis adicional. El adenovirus oncolítico puede ser usado después de la terapia, tal como una cirugía (terapia adyuvante), para tratar metástasis y/o prevenir la metástasis o metástasis adicional.

En una modalidad un virus o formulación de la presente descripción es empleado en la terapia de

mantenimiento.

Concurrentemente como se emplea en la presente está la administración del tratamiento adicional para el cáncer al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo como la
5 formulación del adenovirus oncolítico. El tratamiento puede estar contenido dentro de la misma formulación o administrado como una formulación separada.

En una modalidad el virus es administrado en combinación con la administración de una gente
10 quimioterapéutico.

Agente quimioterapéutico, como se emplea en la presente está propuesto para referirse a agentes químicos antineoplásicos específicos o fármacos que son selectivamente destructivos a células y tejidos malignos. Por ejemplo,
15 agentes de alquilación, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides de plantas, inhibidores de la topoisomerasa, y otros agentes antitumorales. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos específicos incluyen doxorubicina, 5-fluorouracilo (5-FU), paclitaxel, capecitabina, irinotecano,
20 y platinos tales como cisplatino y oxaliplatino. La dosis puede ser elegida por el practicante con base en la naturaleza del cáncer siendo tratado.

En una modalidad el agente terapéutico es ganciclovir, el cual puede asistir en controlar las
25 respuestas inmunes y/o vascularización tumoral.

En una modalidad uno o más terapias empleados en el método de la presente son metronómicas, es decir, es un tratamiento continuo o frecuente con dosis bajas de fármacos anticancerígenos, a menudo dados concomitantemente con otros
5 métodos de terapia.

Los adenovirus oncolíticos del subgrupo B, en particular Ad11 y aquellos derivados de estos tales como EnAd pueden ser particularmente sinérgicos con quimioterapéuticos debido a que parece que tienen un
10 mecanismo de acción que es ampliamente dependiente de la apoptosis, eliminando células cancerosas por un mecanismo predominantemente necrolítico. Sin embargo, la inmunosupresión que ocurre durante quimioterapia puede permitir al virus oncolítico funcionar con mayor eficiencia.

15 La dosis terapéutica como se emplea en la presente se refiere a la cantidad de virus, tal como adenovirus oncolítico que es adecuada para lograr el efecto terapéutico propuesto cuando se emplea en un régimen de tratamiento adecuado, por ejemplo, alivia síntomas o condiciones de una
20 enfermedad, en particular, sin provocar efectos secundarios limitantes de la dosis. Una dosis puede ser considerada una dosis terapéutica en el tratamiento de cáncer o metástasis cuando el número de partículas virales puede ser suficiente para resultar en lo siguiente: el crecimiento metastásico o
25 del tumor es reducido o detenido, o el tumor o metástasis se

encuentra encogido en tamaño, y/o el ciclo de vida del paciente se extiende. Las dosis terapéuticas adecuadas son en general un equilibrio entre el efecto terapéutico y la toxicidad tolerable, por ejemplo, donde el efecto secundario y toxicidad son tolerables dado el beneficio logrado por la terapia.

En una modalidad se proporciona dosis múltiples que se administran sistémicamente de una formulación parenteral de un adenovirus oncolítico de conformidad con la presente descripción en un ciclo de tratamiento único, por ejemplo, en donde la dosis total dada en cada administración está en el intervalo de 1×10^{10} hasta 1×10^{14} partículas virales por dosis.

En una modalidad uno o más dosis (por ejemplo, cada dosis) de virus o composición que comprende la misma es administrada de manera que la velocidad de suministro de partícula viral está en el intervalo de 2×10^{10} partículas por minuto hasta 2×10^{12} partículas por minuto.

En una modalidad un virus o constructo terapéutico de conformidad con la presente descripción (que incluye una formulación que comprende el mismo) es administrado semanalmente, por ejemplo, una semana la dosis es administrada en el día 1, 3, 5 seguido por una dosis cada semana subsecuente.

En una modalidad un virus o constructo terapéutico de conformidad con la presente descripción (que incluye una

formulación que comprende el mismo) es administrada bi-semanalmente, tri-semanalmente, por ejemplo, se administra en la semana 1 uno en los días 1, 3, 5 y en la semana 2 o 3 también se administra en los días 1, 3 y 5 de la misma. Este
5 régimen de dosificación puede ser repetido tantas veces como sea apropiado.

En una modalidad un virus o constructo terapéutico de conformidad con la presente descripción (que incluye una formulación que comprende el mismo) se administra
10 mensualmente, por ejemplo, en un ciclo de tratamiento o como terapia de mantenimiento.

En una modalidad los virus y constructos de la presente descripción son preparados por técnicas recombinante. La persona experta apreciará que el genoma
15 armado del adenovirus puede ser manufacturado por otros medios técnicos, que incluyen sintetizar ampliamente el genoma o plásmido que comprende parte o todo el genoma. La persona experta apreciará que en el caso de sintetizar el genoma la región de inserción no comprende los nucleótidos
20 del sitio de restricción ya que los últimos son artefactos después de la inserción de los genes usando métodos de clonación.

En una modalidad el genoma armado del adenovirus es completamente manufacturado sistémicamente, por ejemplo, como
25 para la SEQ ID NO: 109, la cual se empleó con el casete de

transgenes en las SEQ ID Nos: 18, 20, 96, 101, 102, 103.

La descripción de la presente se extiende, además,
a un adenovirus de fórmula (I) o una sub-fórmula del mismo,
obtenida o que se puede obtener de insertar un transgen o
5 casete del transgen.

“Es” como se emplea en la presente significa que
comprende.

En el contexto de esta especificación “que
comprende” está siendo interpretado como “que incluye”.

10 Modalidades de la invención que comprenden ciertas
características/elementos también están propuestos para
extenderse a modalidades alternativas “que consisten” o “que
consisten esencialmente” de los elementos/características
relevantes.

15 Donde sea técnicamente apropiado, las modalidades
de la invención pueden ser combinadas. Las referencias
técnicas tales como patentes y solicitudes están incorporadas
en la presente por referencia.

Algunas modalidades específicamente e
20 implícitamente mencionadas en la presente pueden formar la
base de una negación ya sea sola o en combinación con una o
más modalidades adicionales.

Los encabezados de la presente son empleados para
dividir el documento en secciones y no están propuestos para
25 ser usados para construir el significado de la descripción

proporcionada en la presente.

La presente invención se describe, además, por medio de ilustración solamente en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Producción de virus EnAd que expresa el antígeno DC80 que activa la célula T

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar el plásmido pNG-330 por inserción directa de un casete que codifica el antígeno DC80 que activa la célula T humana (SEQ ID NO: 11). El casete pNG-330 contiene una secuencia CAGG del aceptor de empalme de 5' corto, secuencia de cADN de CD80 humano y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Un esquemático del casete de transgen se muestra en la Figura 3A. Se confirmó la construcción del plásmido por secuenciamiento de ADN.

Producción y caracterización del Virus

Las referencias en la presente a los virus tales como NG-330-00 son simplemente referencias a los lotes "00" particulares del virus NG-330. Se puede usar nomenclatura similar a otros virus. Se linealizó el plásmido pNG-330 por digestión de restricción con la enzima Ascl para producir el genoma NG-330 del virus (SEQ ID NO: 16). El ADN digerido se purificó por extracción de fenol/cloroformo y se precipitó por 16 horas, -20°C en 300 µl >95% de etanol grado biología molecular y 10 µl de Acetato de Sodio 3M. El ADN precipitado

se formó en pellet centrifugándolo a 14000 rpm, 5 min y se lavó en 500 µl de etanol a 70%, antes de centrifugarse nuevamente, 14000 rpm, 5 min. La pellet de ADN limpia se secó con aire, se resuspendió en 15 µl de reactivo de transfección de lipofectamina que contiene 500 µl de OptiMEM y se incubó por 30 minutos a TA. La mezcla de transfección después se agregó por goteo a un matraz T-25 que contiene 293 células de crecimiento a 70% de confluencia. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección por 2 horas a 37°C, se agregó 5% de CO₂, 4 mls de medio celular (DMEM alto en glucosa con glutamina suplementada con 2% de FBS) a las células y los matraces se incubaron a 37°C, 5% de CO₂.

Las 293 células transfectadas se monitorearon cada 24 horas y se suplementaron con medio adicional cada 48-72 horas. Se monitoreó la producción del virus por observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa de la célula. Una vez que se observó un CPE extensivo, el virus se recolectó a partir de 293 células por tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. Los virus recolectados se usaron para re-infectar las 293 células para amplificar las existencias de virus. Se confirmó la producción de virus viable durante la amplificación por observación de CPE significativo en la monocapa celular. Una vez que se observó CPE, el virus se recolectó a partir de 293 células por tres

ciclos de congelamiento-descongelamiento. La existencia de virus se usó para amplificación adicional antes que el virus se purifique por bandas de cloruro de cesio dobles para producir una existencia de virus NG-330.

5 **Ejemplo 2: Caracterización de actividad del virus NG-330 comparada a EnAd en líneas celular de carcinoma**

Se comparó la replicación de los virus NG-330 o EnAd (valorada por qPCR), y expresión de la membrana CD80 (valorada por citometría de flujo (Figuras 4 y 5) en la línea
10 HT-29celular de carcinoma y línea A549 de la célula de carcinoma. El NG-330 es un virus derivado de EnAd que contiene un casete de transgen que codifica el antígeno que activa la célula T humana, CD80 después del gen tardío EnAd, L5 (Fibra). Se mostró un esquemático del casete insertado en
15 la Figura 3A. Se detalló la producción en el virus NG-330 en el Ejemplo 1. Se sembraron líneas celulares de carcinoma A549 o HT-29 en placas de 6 cavidades a densidades celulares de 7.5e5 células/cavidad por células A549 o 2.e6 células/cavidad por células HT-29. Las placas se incubaron por 18 horas,
20 37°C, 5% de CO₂, antes que las células sean ya sea infectadas con partículas de virus EnAd o NG-330 por célula (ppc) o se dejaron son infectar. Los ensayos se llevaron a cabo a 24, 48 o 72 horas después de la infección.

Replicación del Virus valorada por qPCR

25 Se usaron líneas celulares HT-29 y A549 infectadas

ya sea por 24, 48 o 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-330 o se dejaron sin infectar para cuantificación de ADN viral por qPCR. Se recolectaron los sobrenadantes celulares y se clarificaron por centrifugación por 5 minutos, 1200 rpm. El
5 ADN se extrajo desde 10 µl del sobrenadante usando el Kit de extracción de ADN Genelute de Sigma, de conformidad con el protocolo del fabricante. Cada muestra o estándar extraído se analizó por qPCR usando una serie de cebador-sonda específico al gen E3 de EnAd.

10 La cuantificación del número de genomas de virus detectado por célula demostró que la replicación de virus NG-330 y EnAd fue comparable tanto en la línea celular HT-29 (Figura 4A) como en la línea celular A549 (Figura 4B). No pueden ser detectados genomas de virus en células no
15 infectadas (datos no mostrados).

Expresión de superficie de la célula CD80 valorada por Citometría de Flujo

Se usaron líneas celulares HT-29 y A549 infectadas ya sea por 24, 48 o 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-330 o
20 se dejaron sin infectar para análisis de expresión del transgen CD80 en la superficie celular. Se removieron células de tumor a partir de la superficie de la placa por tratamiento con tripsina, se centrifugaron y después se resuspendieron en 1% de BSA/PBS. Las muestras después se
25 incubaron ya sea a 5°C por 1 hora con amortiguador, conjugado

de anticuerpo control de isotipo de ratón a Cy5 o anticuerpo CD80 anti-humano conjugado a Cy5 (clon 2D10). Todas las muestras también se co-tiñeron con Zombie Aqua vivo/muertos para diferenciar las células viables. Las muestras se lavaron
5 3 veces con 1% de BSA/PBS antes del análisis por citometría de flujo (FACS, Attune) para viabilidad celular y expresión de proteína CD80 en la superficie celular. El análisis mostró que CD80 puede ser detectado en la superficie celular tanto en células A549 (Figura 5A) como en HT-29 (Figura 5B)
10 tratadas con NG-330 pero no aquellas tratadas con EnAd o se dejaron sin tratar.

Comparación de potencia oncolítica del virus

Se sembraron células de carcinoma de colon HT-29 en placas de 96 cavidades a una densidad celular de 2.5×10^4
15 células/cavidad. Las placas se incubaron por 4 horas, 37°C , 5% de CO_2 , antes que las células sean infectadas con partículas de virus ya sea EnAd o con NG-330 a un intervalo de densidad de infección de 100-0.39 partículas por célula (ppc). Se valoró la viabilidad de la célula HT-29 usando el
20 Reactivo Cell Titre 96 MTS (Promega: G3581) 72 horas después de la infección. La cuantificación del % de sobrevivencia celular a cada densidad de infección demostró que la potencia oncolítica de NG-330 fue comparable a EnAd en las células HT29 (Figura 6).

Ejemplo 3: Producción del virus EnAd que expresa el antígeno CD80 que activa la célula T y la citocina IFN α

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar el plásmido pNG-343 por inserción directa de un casete que
 5 codifica el antígeno CD80 que activa la célula T (SEQ ID NO: 11) y el interferón α de citocina humana (IFN α , SEQ ID NO 12). El casete pNG-343 contiene; una secuencia CAGG aceptora de empalme 5' corto; cADN de IFN α humano; una secuencia de péptido P2A auto-escindido muy eficiente (SEQ ID NO: 7);
 10 secuencia cADN de CD80 humana y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Se muestra en la Figura 3B un esquemático del casete de transgen insertado. Se confirmó la construcción del plásmido por secuenciamiento de ADN.

Producción y caracterización del virus

15 El plásmido se pNG-343 se linealizó por digestión de restricción con la enzima AscI para producir el genoma NG-343 de virus (SEQ ID NO: 17). El virus NG-343 se amplificó y se purificó de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 1.

20 **Ejemplo 4: Producción del virus EnAd que expresa el dominio extracelular del ligando tirosina cinasa-3 similar a FMS, la quimiocina MIP1 y la citocina IFN α**

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar el plásmido pNG-345 por inserción directa de un casete que
 25 codifica una variante soluble del ligando de tirosina cinasa-

3 similar a FMS (Flt3L, SEQ ID NO: 13) MIP1 α (isoforma LD78 β ,
 SEQ ID NO: 14) e IFN α (SEQ ID NO: 12). El casete pNG-345
 contiene; una secuencia CAGG aceptora de empalme 5' corto;
 cADN Flt3L humana; una secuencia de péptido P2A de auto-
 5 escisión muy eficiente (SEQ ID NO: 7); cADN MIP1 α humana; una
 secuencia de péptido T2A de auto-escisión muy eficiente (SEQ
 ID NO: 10); cADN IFN α humana y una secuencia de
 poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Se muestra en la Figura 3D
 un esquemático del casete de transgen insertado. La
 10 construcción del plásmido se confirmó por secuenciamiento de
 ADN.

Producción y caracterización de virus

El plásmido pNG-345 se liniealizó por digestión de
 restricción con la enzima AscI para producir el genoma NG-345
 15 del virus (SEQ ID NO: 18)). El virus NG-345 se amplificó y
 purificó de conformidad con los métodos detallados en el
 Ejemplo 1.

Ejemplo 5: Producción de virus EnAd que expresan el antígeno DC80 que activa la célula T, la quimiocina MIP1 α y 20 Ligando Flt3

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar los
 plásmidos pNG-346 por inserción directa de un casete que
 codifica el antígeno CD80 que activa la célula T humana (SEQ
 ID NO: 11), la proteína 1 α inflamatoria de macrófago humana
 25 (MIP1 α , SEQ ID NO: 14) y el ligando Flt3 humano (SEQ ID NO:

13). El casete pNG-346 contiene; una secuencia CAGG aceptora de empalme 5' corta; cADN de IFN α humano; una secuencia de péptido P2A de auto-escisión muy eficiente (SEQ ID NO: 7); cADN de MIP1 α humana (isoforma LD78 β); una secuencia de
 5 péptido T2A de auto-escisión muy eficiente (SEQ ID NO: 10); secuencia de cADN del Ligando Flt3 humano y secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Se muestra en la Figura 3E un esquemático del casete de transgen insertado. Se confirmó la construcción del plásmido por secuenciamiento de ADN.

10 **Producción y caracterización de virus**

El plásmido pNG-346 se linealizó por digestión de restricción con la enzima AscI para producir el genoma NG-346 del virus (SEQ ID NO: 19). El virus NG-346 se amplificó y purificó de conformidad con los métodos detallados en el
 15 Ejemplo 1.

Ejemplo 6: Producción de virus EnAd que expresan el antígeno CD80 que activa la célula T, la quimiocina MIP1 α y la citocina IFN α

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los
 20 plásmidos pNG-347 por inserción directa de un casete que codifica el antígeno CD80 que activa la célula T humana (SEQ ID NO: 11), la Proteína Inflamatoria de macrófago humana 1 α (MIP1 α , SEQ ID NO: 14) e interferón α de citocina humana (IFN α , SEQ ID NO: 12). El casete pNG-347 contiene secuencia
 25 CAGG aceptora de empalme 5' corto; cADN de IFN α humano; una

secuencia de péptido P2A de auto-escisión muy eficiente (SEQ ID NO: 7); cADN MIP1 α humano (isoforma LD78 β); una secuencia de péptido T2A de auto-escisión muy eficiente (SEQ ID NO: 10); secuencia de cADN CD80 humana y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Se muestra en la Figura 3F un esquemático del casete de transgen insertado. Se confirmó la construcción del plásmido por secuenciamiento de ADN.

Producción y caracterización de virus

El plásmido pNG-347 se linealizó por digestión de restricción con la enzima AscI para producir el genoma NG-347 del virus (SEQ ID NO: 20). El virus NG-347 se amplificó y purificó de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 1.

Ejemplo 7: Producción de virus EnAd que expresan el antígeno CD80 que activa la célula T y un anticuerpo del fragmento Fv de cadena sencilla anclada a la membrana para la cadena ϵ del complejo CD3 humano (CD3 ϵ)

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los plásmidos pNG-348 por inserción directa de un casete que codifica el antígeno CD80 que activa la célula T humana (SEQ ID NO: 11) y una forma quimérica anclada a la membrana de la CD3 ϵ anti-humana Fv de cadena sencilla (SEQ ID NO: 15). El casete pNG-348 contiene una secuencia CAGG aceptora de empalme 5' corto; cADN scFv CD3 ϵ anti-humano anclada a la membrana; una secuencia de péptido P2A de auto-escisión muy

eficiente (SEQ ID NO: 7); secuencia de cADN CD80 humana y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Se muestra en la Figura 3C un esquemático del casete de transgen insertado. Se confirmó la construcción del plásmido por secuenciamiento de ADN.

Producción y caracterización de virus

El plásmido pNG-348 se linealizó por digestión de restricción con la enzima AscI para producir el genoma NG-348 del virus (SEQ ID NO: 96). El virus NG-348 se amplificó y purificó de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 1.

Ejemplo 8: Actividad del virus EnAd, NG-343 que expresa dos genes; el antígeno CD80 que activa la célula T y la citocina IFN α

Caracterización de la actividad del virus NG-343 comparada a EnAd en líneas celular de carcinoma

La replicación de virus NG-343 o EnAd (valorada por qPCR), expresión del transgen CD80 (valorada por citometría de flujo) o expresión del transgen IFN α (valorada por ELISA) se comparó en la línea celular de carcinoma de colon, HT-29 o la línea celular de carcinoma de pulmón, A549. El NG-343 es un virus derivado de EnAd que contiene un casete de transgen que codifica el antígeno que activa la célula T, CD80 así como también el Interferón alfa 2b de citocina humana localizado después del gen tardío EnAd, L5 (Figura). Se

muestra en la Figura 3B un esquemático del casete insertado. La producción del virus NG-343 se detalla en el Ejemplo 3. Se sembraron las líneas celulares de carcinoma A549 o HT-29 en placas de 12 cavidades a densidades celular de 7.5×10^5 5 células/cavidad para células A549 o 1.4×10^6 células/cavidad para células HT-29. Las placas se incubaron por 18 horas, 37°C , 5% de CO_2 , antes que las células sean infectadas con ya sea EnAd o NG-343 a 100 partículas de virus por célula (ppc) o se dejaron sin infectar. Los ensayos se llevaron a cabo a 10 24, 48 o 72 horas después de la infección.

Replicación de virus valorada por qPCR

Se usaron células HT-29 por 24, 48 o 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-343 o se dejaron sin infectar para cuantificación de ADN viral por qPCR. Se recolectaron los 15 sobrenadantes celulares y se clarificaron por centrifugación por 5 minutos, 1200 rpm. El ADN se extrajo desde 10 μl del sobrenadante usando el Kit de extracción de ADN Genelute de Sigma, de conformidad con el protocolo del fabricante. También se preparó una curva estándar usando las partículas 20 del virus EnAd (2.5×10^{10} hasta 2.5×10^5 vp) y se extrajo usando el Kit Sigma Genelute. Se analizó cada muestra o estándar extraído por qPCR usando una serie de cebador-sonda específica al gen E3 de EnAd.

La cuantificación del número de genomas de virus 25 detectado por célula demostró que la replicación de virus NG-

330 y EnAd fue comparable en todos los puntos de tiempo analizados (Figura 7A). No pueden ser detectados genomas de virus en células no infectadas (datos no mostrados).

Análisis de la expresión IFN α por ELISA

5 Los sobrenadantes de las líneas celular HT-29 o A549 infectadas por 24, 48 o 72 horas con 10 ppc de EnAd o NG-343 o se dejaron sin infectar, se analizaron por expresión de IFN α secretado por ELISA. Se removieron los sobrenadantes cultivados de cada cavidad y se centrifugaron por 5 minutos,
10 1200 rpm para remover el desecho celular. Los sobrenadantes se diluyeron en 5% de amortiguador de ensayo BSA/PBS (1:2 o 1:50 o 1:100) y se llevó a cabo el ELISA usando el Kit IFN alfa human Verikine (ciencia de ensayo Pbl) de conformidad con el protocolo del fabricante.

15 Se determinaron las concentraciones de IFN α secretada interpolando las curvas estándar. Se detectó la expresión de IFN α la cual se incrementó en los sobrenadantes celulares durante el curso de la infección tanto en las líneas celular HT-29 como en la A549 (Figura 7B).

Expresión de superficie de la célula CD80 valorada por Citometría de Flujo

Se usaron líneas celulares A549 infectadas por 48 o 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-343 o se dejaron sin infectar para análisis de expresión del transgen CD80 en la
25 superficie celular. En el punto de tiempo apropiado después

de la infección, se removieron células A549 de la superficie de la placa por tratamiento con tripsina, se centrifugaron y después se resuspendieron en 1% de BSA/PBS. Las muestras después se incubaron ya sea a 5°C por 1 hora con
5 amortiguador, anticuerpo control de isotipo de ratón conjugado a Cy5 o anticuerpo CD80 anti-humano conjugado a Cy5 (clon 2D10). Todas las muestras también se co-tiñeron con Zombie Aqua vivos/muertos para diferenciar las células viables. Las muestras se lavaron 3 veces con 1% de BSA/PBS
10 antes del análisis por citometría de flujo (FACS, Attune) para viabilidad celular y expresión de proteína CD80 en la superficie celular. El análisis de la expresión CD80 contra teñido vivo/muerto mostró que a tanto 48 como 72 horas después de la infección de CD80 puede ser detectado en la
15 superficie celular celulares tratadas con NG-343 pero no en células EnAd o de control no infectadas (UIC) (Figura 8). La viabilidad celular a 72 horas después del tratamiento no fue suficiente para llevar a cabo en análisis de expresión de CD80 compresivo, sin embargo se pueden detectar niveles altos
20 de CD80 tanto en el hígado como en las células muertas tratadas con NG-343 en este punto de tiempo (Figura 8D, panel inferior).

La expresión de proteína CD80 después se comparó en células HT-29 y A549 a 48 horas después de la infección con
25 100 ppc. Las muestras se recolectaron y se tiñeron como

anteriormente antes del análisis de viabilidad celular y la expresión de la proteína CD80 en la superficie celular. El análisis de la expresión CD80 en este punto de tiempo en solamente células teñidas como células vivas mostró que la
5 CD80 puede ser detectada en la superficie de ~91% celulares HT-29 tratadas con NG-343 y ~98% celulares A549 tratadas con NG-343 pero no en los controles tratados con EnAd.

Ejemplo 9: Selectividad de la actividad del virus NG-343 y expresión del transgen en líneas celular de carcinoma, fibroblastos estromales y epiteliales.

10

Para mostrar que el IFN α y transgenes CD80 codificados en el virus NG-343 son selectivamente expresados solamente en las células permisivas a infecciones por NG-343 o EnAd, la replicación del virus (valorada por qPCR),
15 expresión de IFN α (valorada por ELISA) y expresión CD80 (valorada por citometría de flujo) se midieron en células cancerosas (HT-29) conocidas por ser permisivas para infección EnAd, líneas celulares de fibroblasto (WI-38 y MRC-5) previamente caracterizado por ser no permisivo y una línea
20 celular epitelial bronquial (BE) la cual muestra solamente limita la permisividad a la infección por EnAd. De manera breve, las células se sembraron en placas de 12 cavidades y se infectaron 18 horas después de la siembra con 100 ppc del virus NH-343 o EnAd por células WI38, MRC5 o BE o 10 ppc del
25 virus NG-343 o EnAd por las células HT-29. Las células se

incubaron con partículas de virus por 4 horas antes de remover el medio de infección de las células y reemplazarlo con medio de cultivo fresco. A 1 hora o 72 horas después del periodo de infección de 4 horas, los sobrenadantes celulares
5 se recolectaron para análisis qPCR o ELISA y las células se trataron con tripsina para removerlas de las placas para análisis por citometría de flujo.

Replicación del virus selectivo a NG-343 y EnAd

Para qPCR, se recolectaron los sobrenadantes
10 celulares y se clarificaron por centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. Se extrajo el ADN a partir de 10 µl del sobrenadante usando el kit de extracción de ADN Genelute de Sigma, de conformidad con el protocolo del fabricante. También se preparó una curva estándar usando partículas de
15 virus EnAd (2.5×10^{10} a 2.5×10^5 vp) y se extrajo usando el kit Genelute de Sigma. Cada muestra o estándar extraído se analizó por qPCR usando una serie cebador-sonda específica para el gen E3 EnAd.

La cuantificación del número de genomas de virus
20 detectado por célula, demostró que la replicación del virus NG-343 o EnAd fue comparable en todas las líneas celulares analizadas (Figura 9A).

Expresión de transgen selectivo a NG-343

Para la detección IFN α , se recolectaron los
25 sobrenadantes celulares y se clarificó por centrifugación

durante 5 minutos, 1200 rpm. Se diluyeron los sobrenadantes en 5% de amortiguador de ensayo BSA/PBS (1:2 o 1:50 o 1:1000) y se llevó a cabo usando el ELISA usando el kit IFN α humano Verikine (ciencia de ensayo PbI) de conformidad con el protocolo del fabricante.

Se determinaron las concentraciones de IFN α secretada interpolando la curva estándar. Solamente pude ser detectada la expresión de IFN α en los sobrenadantes celulares HT-29 infectadas con NG-343 y no son detectables (menor al límite inferior de la cuantificación [$<LLQ$]) en ya sea las líneas celular de fibroblastos o la línea celular epitelial bronquial (Figura 9B).

Para la expresión de superficie de la célula CD80, las células son ya sea incubada a 5°C por 1 hora con amortiguador, anticuerpo de control de isotipo de ratón conjugado a Cy5 o anticuerpo CD80 anti-humano conjugado a Cy5 (clon 2D10). Todas las muestras también se co-tiñeron con Zombie Aqua vivo/muerto a células viables diferenciadas. Las muestras se lavaron 3 veces con 1% de BSA/PBS antes del análisis por citometría de flujo (FACS, Attune) para viabilidad celular y expresión de proteína CD80 en la superficie celular. Manteniéndose con los datos de expresión IFN α , la expresión CD80 puede únicamente ser detectada en las células HT-29, sin expresión detectable en ya sea las líneas celular epotelial de fibroblasto o bronquial (Figura 9C).

Tomados juntos estos datos demostraron que los transgenes tanto IFN α como CD80 son selectivamente expresados en células permisibles a la infección con el virus EnAd, es decir, células de carcinoma y la codificación de los transgenes no alteran la selectividad del virus NG-343 cuando se compara con el virus EnAd parenteral.

Ejemplo 10. Actividad de la expresión del transgen NG-343 en activación de la célula inmadura

Para determinar si el tratamiento celulares del tumor con el virus NG-343 puede conducir a mejorar las respuestas celular inmadura innatas comparadas al no tratamiento o al tratamiento de EnAd, las células mononucleares de sangre periférica aisladas del tumor (PBMCs) son co-cultivadas con células de tumor ya sea infectada con NG-343 o EnAd o dejadas sin infectar. La activación celular inmune se valoró por análisis de citometría de flujo de poblaciones celular inmune innata o análisis ELISA de sobrenadantes del co-cultivo. De manera breve, se sembraron células de carcinoma de pulmón A549 en placas de 12 cavidades a una densidad de 4×10^5 células/cavidad. Después de 20 horas, las células se infectaron con 10 ppc del virus EnAd o NG-343 o se dejaron sin infectar y después se incubaron por 24 horas, 37 grados, 5% de CO₂. Las PBMCs aisladas de un donador humano saludable por centrifugación del gradiente de densidad después se agregaron a las cavidades de cultivo A549 a una

relación de 5 PBMCs a 1 célula A549. A las 48 horas después de la adición de los sobrenadantes del co-cultivo de PBMCs se recolectaron a partir de las placas. Para analizar la activación de la célula dendrítica en este punto, las células se incubaron a 5°C por 1 hora con el amortiguador, anticuerpos de control de isotipo de ratón conjugados a Alexa Fluor 488, PE, PerCP/Cy5.5, BV605 o BV412, anticuerpo anti-CD14 conjugado a Alexa Fluor 488, anticuerpo anti-CD80 conjugado a PE, anti-HLA-DR conjugado a PerCP.Cy5.5, anti-CD3 conjugado a BV605 o anticuerpo anti-PD-L1 conjugado a BV421. Todas las muestras también se co-tiñeron con Zombie Aqua vivo/muerto para diferenciar células viables. Las muestras se lavaron 3 veces con 1% de BSA/PBS antes del análisis por citometría de flujo (FACS, Attune). Las células viables negativas que se tiñeron para tanto CD14 como para CD3 pero positivas para HLA-DR son definidas como la población celular dendrítica. La expresión del marcador de activación DC, CD80 y PD-L1 fue comparada en esta población (Figura 10). Estos análisis revelaron que las células de tumor infectadas con NG-343 pueden inducir niveles de superficie incrementadas tanto de CD80 como de PD-L1 en la superficie de DCs cuando se compara a EnAd infectado o cultivo celular de tumor no infectado.

Ejemplo 11. Actividad del virus EnAd, NG-347, que expresa tres transgenes; el antígeno CD80 que activa la célula T, la quimiocina MIP1 α y la citocina IFN α

Caracterización de la actividad del virus NH-347

5 comparada a EnAd en líneas celular de carcinoma

La expresión del transgen CD80 (valorada por citometría de flujo) y expresión del transgen IFN α o MIP1 α (CCL3) (valorado por ELISA) se comparó en la línea celular de carcinoma de colon tratada con NG-347 y EnAd, línea celular
 10 HT-29 o de carcinoma de pulmón, A549. El NG-347 es un virus derivado de EnAd que contiene un casete de transgen que codifica el antígeno que activa la célula T humana, CD80, el Interferón alfa 2b de citocina humana y el MIP1 α de citocina humano (isoforma LD78 β). La expresión del transgen está bajo
 15 el control del promotor tardío principal endógeno del virus. Se muestra en la Figura 3F un esquemático del casete insertado. Se detalla la producción del virus NG-347 en el Ejemplo 6. Se sembraron las líneas de carcinoma A549 o HT-29 en placas de 12 cavidades a densidades celular de 7.5×10^5
 20 células/cavidad para células A549 o 1.4×10^6 células/cavidad para células HT-29. Las placas se incubaron por 18 horas, 37°C, 5% de CO₂, antes que las células sean ya sea infectada con 100 partículas del virus EnAd o NG-347 por célula (ppc) o se dejan sin infectar. Los ensayos se llevaron a cabo a 24,
 25 48 o 72 horas después de la infección.

Análisis de la IFN α o expresión MIP1 α por ELISA

Los sobrenadantes de las líneas celulares HT-29 o A549 por 24, 48 o 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-347 o se dejaron sin infectar, se analizaron para expresión de IFN α secretada o MIP1 α secretada por ELISA.

Se prepararon los sobrenadantes de cultivo de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Se llevó a cabo el ELISA de IFN α usando el Kit de IFN alfa humano Verkine (ciencia de ensayo Pbl) y se llevó a cabo ELISA de MIP1 α usando el kit ELISA Quantikine CCL3 humano (R & D systems). Ambos ensayos se llevaron a cabo de conformidad con el protocolo del fabricante.

Se determinaron las concentraciones de IFN α o MIP1 α secretadas por interpolación de las curvas estándar. La expresión de IFN α u MIP1 α incrementada en los sobrenadantes celulares sobre el curso de la infección y se detectó para las líneas celulares tanto HT-29 como A549 (Figura 11A) y Figura 11B).

Análisis de la expresión CD80 por citometría de flujo

Se comparó la expresión de proteína CD80 en la superficie de las células HT-29 y A549 a 48 horas después de la infección. Las células se recolectaron y se tiñeron de conformidad con los métodos detallados en el ejemplo 9. Las células se analizaron para viabilidad celular y expresión de

la proteína CD80 en la superficie celular por citometría de flujo. En análisis de la expresión CD80 en este punto de tiempo en las células vivas mostró que el CD80 puede ser detectado en la superficie de ~96% celulares HT-29 tratadas con NG-347 y ~99% celulares A549 tratadas con NG-347 pero no teñidas se detectaron en los controles tratados con EnAd (Fig. 11C).

Ejemplo 12: Actividad del virus EnAd, NG-345, que expresa tres transgenes; el Ligando Flt3 de citocina, la quimiocina MIP1 α y la citocina IFN α

Caracterización de la actividad del virus NG-345 comparada a EnAd en líneas celular de carcinoma

Se compararon el ligando Flt3, la expresión del transgen IFN α y MIP1 α (valorada por ELISA) en línea celular de carcinoma de colon tratada con NG-345 y EnAd, línea celular de carcinoma HT-29 o de pulmón, A549, el NG-345 es un virus derivado de EnAd que contiene un casete de transgen que codifica una variante soluble del ligando Flt3 humano, el Interferón alfa 2b de citocina humano y el MIP1 α de quimocina humano (isoforma LD78 β). La expresión del transgen está bajo el control del promotor tardío principal endógeno del virus. Se muestra en la Figura 3D un esquemático del casete insertado. Se detalló la producción del virus NG-345 en el Ejemplo 4. Se sembraron las líneas celulares de carcinoma A549 o HT-29 en placas de 12 cavidades a densidades celulares

de 7.5x10⁵ células/cavidad para células A549 o 1.4x10⁶ células/cavidad para células HT-29. Las placas se incubaron por 18 horas, 37°C, 5% de CO₂, antes que las células sean ya sea infectada con 100 partículas de virus EnAd o NG-345 por
5 célula (ppc) o se dejaron sin infectar. Se llevaron a cabo ensayos por 24, 48 o 72 horas después de la inyección.

Análisis del Ligando Flt3, IFN α o expresión MIP1 α por ELISA

Los sobrenadantes de las líneas celulares HT-29 y
10 A549 infectadas por 24, 48 o 72 horas con 100 ppc de EnAd o NG-345 o se dejaron sin infectar se analizaron para expresión del ligando Flt3 secretado, IFN α secretado o MIP1 α secretado por ELISA.

Se prepararon los sobrenadantes del cultivo de
15 conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Se llevó a cabo el ELISA de IFN α usando el Kit de IFN alfa humano Verikine (ciencia de ensayo Pbl), se llevó a cabo el ELISA de MIP1 α usando el Kit ELISA Quantikine CCL3 (R & D systems) y se llevó a cabo ELISA de Flt3 usando el kit ELISA
20 de Flt3 humano (Abcam). Todos los ensayos se llevaron a cabo de conformidad con el protocolo del fabricante.

Se determinaron las concentraciones de IFN α , MIP α o Flt3L secretadas interpolando las curvas estándar. La expresión de IFN α , MIP α y Flt3L se incrementaron en los
25 sobrenadantes celulares durante el curso de infección y se

detectó en las líneas celulares tanto HT-29 como en A549 (Figura 12A-C).

Ejemplo 13: Actividad oncolítica e infectividad de los virus NG-347 y NG-348 en células de carcinoma de colon

5 **Potencia oncolítica de Virus**

Se sembraron células de carcinoma de colon HT-29 en placas de 96 cavidades a una densidad celular de 2.5×10^4 células/cavidad. Las placas se incubaron por 4 horas, 37°C , 5% de CO_2 , antes que las células sean ya sea infectada con
10 partículas de virus EnAd, NG-347 o NG-348 en un intervalo de densidad de infección de 100-0.39 partículas por célula (ppc). Se valoró la viabilidad de la célula HT-29 usando el Reactivo MTS Cell Titre 96 (Promega: G3581) 72 horas después de la infección. La cuantificación del % de supervivencia de
15 la célula en cada densidad de infección demostró que la potencia oncolítica de NG-347 y NG-348 fue comparable a EnAd (Figura 13A y 13B).

Infectividad de partícula viral

Se sembraron las células de carcinoma de colon HT-
20 29 en placas de 12 cavidades a una densidad celular de 4×10^5 células/cavidad. Las placas se incubaron por 24 horas, 37°C , 5% CO_2 , antes de las células son ya sea infectadas con partículas de virus EnAd, NG-347 o NG-348 en un intervalo de densidad de infección de 1.6×10^7 - 2×10^6 vp/ml. Se detectó la
25 infección de las células HT-29 por teñido del anticuerpo del

hexon de la proteína del virus. Las células teñidas se cuantificaron por conteo manual de 6 campos de revisión por cavidad, a través de 6 cavidades de réplica por cada dilución probada. La partícula para relación de infectividad (P:I) se
5 calculó para cada virus a partir del título viral y demostró tanto NG-347 como NG-348 que tiene relaciones de infectividad similar a los controles de referencia EnAd (Figura 13C).

Ejemplo 14: Expresión de la superficie celular del antígeno CD80 que activa la célula T en líneas celular de carcinoma NG-347 y NG-348

Se comparó la expresión del transgen CD80 (valorada por citometría de flujo) en línea celular de carcinoma de colon tratada con NG-347, NG-348 y EnAd, línea celular de carcinoma DLD-1 o de pulmón, A549. Se sembraron
15 las líneas celulares de carcinoma A549 o DLD-1 en placas de 12 cavidades a densidades celular de 7.5×10^5 células/cavidad. Las placas se incubaron por 18 horas, 37°C, 5% CO₂, antes que las células sean ya sea infectadas con 10 partículas de virus EnAd, NG-348 o NG-347 por célula (ppc) o se dejaron sin
20 infectar. La expresión de la proteína CD80 se comparó en la superficie de las células A549 o DLD-1 a 24, 48, 72 o 96 horas después de la infección. En cada punto de tiempo las células se recolectaron y se tiñeron de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 9. Las células se analizaron
25 para viabilidad celular y expresión de proteína CD80 en la

superficie celular por citometría de flujo. El análisis de la expresión CD80 a 72 horas después de la infección en células A549 mostró que la CD80 puede ser detectada en la superficie de >95% de las células tratadas con NG-347 o NG-348 (Figura 14A y 14B). A 96 horas después de la infección, los tratamientos del virus han lisado la mayoría de las células A549 por lo tanto no se llevó a cabo el análisis FACS. Para las células DLD-1 se puede detectar la expresión en >50% celulares por 96 horas después del tratamiento con NG-348 y >70% celulares siguiendo el tratamiento con NG-347 (Figura 15A y 15B). No se detectó teñido en EnAd y controles sin tratamiento.

Ejemplo 15: Activación de la célula T y desgranulación mediada por las líneas celular de carcinoma infectadas con NG-348

Las células de carcinoma de pulmón A549, son ya sea infectada con partículas del virus NG-348 o EnAd o se dejaron sin infectar, se co-cultivaron con células T aisladas de donadores PBMC humano. La selectividad de expresión de CD80 infectado por el virus NG-348 se valoró en la superficie de las células tanto A549 como T por citometría de flujo. Se valoró analizando la activación de la célula T por marcadores de activación de la superficie de la célula (por citometría de flujo), la expresión de superficie de la célula CD107a como un marcador para desgranulación (por citometría de

flujo) y la secreción de citocinas estimuladoras, IL-2 e IFN γ (por ELISA).

Se sembraron las células A549 en placas de 12 cavidades a una densidad de 5e5 células/cavidad. Las placas
5 se incubaron por 18 horas, 37°C, 5% de CO₂, antes que las células sean ya sea infectada con 10 partículas del virus EnAd o NG-348 por célula (ppc) o se dejaron sin infectar. A 48 horas después de la infección, las células T CD3, aisladas por selección negativa de PBMCs (MACs) se agregaron a las
10 monocapas de la célula A549 a una relación de 8 células T: El co-cultivo se llevó a cabo por 16 horas punto después del cual los sobrenadantes se recolectaron por análisis ELISA y las células de tumor y las células T se recolectaron por análisis de citometría de flujo.

15 Se removió el medio de cultivo que contiene células no adherentes de las cavidades de co-cultivo y se centrifugó (300xg). Lo sobrenadante se removió cuidadosamente, se diluyó 1 en 2 con PBS 5% de BSA y se almacenó para análisis ELISA. Las monocapas de la célula adherente se lavaron una vez con
20 PBS y después se separaron usando tripsina. La tripsina se inactivó usando medio completo y las células se agregaron a las pelotillas celulares que se han recolectado a partir de los sobrenadantes del cultivo. Las células se centrifugaron (300xg), lo sobrenadante se desechó y la pelotilla celular se
25 lavó en 200 μ l de PBS. Las células se centrifugaron

nuevamente, después se resuspendieron en 50 μ l de amortiguador FACS (5% de BSA PBS) que contiene Aqua Vivo/Muerto (Life tech) por 15 minutos a TA. Las células se lavaron una vez en amortiguador FACS antes del teñido con paneles de anticuerpos directamente conjugados: anti-CD3 conjugado a BV605; anti-CD25 conjugado a BV421; anti-CD107a conjugado a FITC; anti-EpCam conjugado a PE o anti-CD4 conjugado a PE; y ya sea anti-CD80 conjugado a PE/Cy5 o anti-HLA-DR conjugado a PE/Cy5. También se tiñó una muestra celular de cada condición de co-cultivo con anticuerpos de control de isotipo relevante. Todos los teñidos se llevaron a cabo en amortiguador FACS en un volumen total de 50 μ l/cavidad por 15 minutos, 4°C. Las células después se lavaron con amortiguador FACS (200 μ l) antes de la resuspensión en 200 μ l de amortiguador FACS y análisis por citometría de flujo (Attune)

Expresión selectiva de CD80

Se manera similar a los resultados en el ejemplo 14, la expresión CD80 fue detectable en la superficie de >80% celulares A549 EpCam+ infectadas por NG-348, pero no infectadas por EnAd o células control no infectadas (Figura 16). En contraste las células T CD3+ no mostraron expresión detectable de CD80 en la superficie celular indicando, al menos bajo estas condiciones experimentales, que la expresión del transgen es selectiva para células de tumor en el co-

cultivo.

Sobrerregulación de marcadores de activación de la célula T

Se valoró el análisis de citometría de flujo de la
5 activación de la célula T por expresión de los marcadores de
activación de la célula T CD25 y HLA-DR en vivo, DCD3+,
células sencillas. Estos datos mostraron que tanto el número
de CD25 que expresan las células T (Figura 17A y 17B) como el
nivel promedio de la expresión CD25 en la superficie de la
10 célula T (Figura 17C) son significativamente mayores para las
células T cultivadas con células A549 infectadas con NG-348
que EnAd o controles no infectadas. Específicamente, no
existen diferencias en el estado de la activación de la
célula T cuando se compara a controles no tratados a EnAd
15 (26.9% $\pm$ 3.4% y 25.3% $\pm$ 3.5% de CD25 que expresan células T,
respectivamente) mientras que CD25 fue sobrerregulado en la
mayoría de las células co-cultivadas con NG-348 (83.2 $\pm$
1.5%). La expresión CD25 también se analizó en subseries
celular T CD4 y CD8 activando las células T CD3+ con base en
20 su expresión de CD4. Estos análisis mostraron que la
expresión CD25 es significativamente sobrerregulada en las
subseries celular T tanto CD4+ como CD4- en co-cultivos
tratados con NG-348 comparados a EnAd y controles no
infectados (Figura 18).

25 En contraste a CD25, el número celulares que

expresan HLA-DR fue bajo, <5%, para todas las condiciones probadas (Figura 19A). Esto es igualmente debido al punto de tiempo temprano después del co-cultivo en el cual se llevó a cabo en análisis de citometría de flujo. Sin embargo, existen
 5 un ligero pero significativo incremento en la intensidad de fluorescencia media celulares CD3+HLA-DR+ teñidas con HLA-DR a partir de co-cultivos tratados con NG-348 comparados a los controles (Figura 19B).

Simulación de desgranulación de la célula T

10 Análisis de la expresión CD107a en la superficie celulares T CD3+, vivas mostraron un incremento significativo en el número celulares T las cuales se han desgranulados y por lo tanto son teñidas con CD107a, cuando las células A549 se infectaron con NG-348 ($8.3\% \pm 1.7\%$ celulares) comparadas a
 15 ya sea EnAd ($0.6\% \pm 0.2\%$ de las células) o controles no tratados ($0.1\% \pm 0.02\%$ celulares)(Figura 20). De manera similar a sobrerregulación CD25, las subseries de la célula T tanto CD4+ y CD4- mostraron expresión de CD107a significativamente incrementada comparado a los controles EnAd
 20 o A549 (Figura 21).

Secreción de las citocinas IL-1 e IFN γ estimuladoras

Para detección de expresión IL-2 o IFN γ , se diluyeron sobrenadantes del co-cultivo en 5% de amortiguador
 25 de ensayo BSA/PBS (en un intervalo de 1:100 a 1:1000) y se

llevó a cabo ELISA usando el Kit IL-2 humano Ready Set go (Affymetrix) o kit IFN gamma humano Ready set go (Affymetrix) de conformidad con el protocolo del fabricante.

Las concentraciones de IL-2 o IFN γ secretadas se
 5 determinaron interpolando las curvas estándar. La expresión de IL-2 puede solamente ser detectada en los sobrenadantes de los co-cultivos usando células A549 infectadas con NG-348 y o fue detectable en ya sea EnAd, o los controles no tratados (Figura 22A). La expresión de IFN γ puede también ser
 10 detectada, a niveles muy altos (>300 ng/ml) en los sobrenadantes de co-cultivos celulares A549 infectadas con NG-348, las cuales fueron significativamente mayores que ya sea EnAd o controles sin tratar (Figura 22B).

Ejemplo 16: Activación de la célula T de las
 15 **células CD4 y CD8 pueden ser independiente mediadas por**
líneas celular de carcinoma infectadas por NG-348

Las células de carcinoma de pulmón A549 infectadas con partículas de virus NG-348 o EnAd o se dejaron sin infectar, se co-cultivaron con ya sea células T CD4+ o
 20 células T CD8+ aisladas de donadores PBMC humano. Se valoró la activación de la célula T por la secreción de citocina IFN γ estimuladora en sobrenadantes de cultivo.

Se sembraron las células A549 y se infectaron con partículas de virus NG-348 o EnAd o se dejaron sin infectar
 25 de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 14. 8

horas después de la infección con células T CD4+ o células T CD8+ aisladas por selección negativa de un donador PBMC se agregaron a la monocapa de la célula A549 a una relación de 8 células T. Después de 16 horas de co-cultivo, los sobrenadantes se recolectaron y valoraron para IFN γ de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 14.

Para las células T CD4', la expresión de IFN γ fue solamente detectada en los sobrenadantes de co-cultivos de las células A549 infectadas con NG-348 y no se detectó en ya sea EnAd o controles sin tratar (Figura23A). Para las células T CD8+, la expresión de IFN γ se detectó a niveles significativamente altos para células A549 infectadas con NG-348 que para EnAd o controles sin tratar (Figura 23B), demostrando que las células tanto CD8 como CD4 pueden ser activadas para secretar IFN γ por actividad del virus NG-348 en líneas celular de tumor.

Ejemplo 17. La activación de la célula T mediada por líneas celular de carcinoma infectada con NG-347

Las células de carcinoma de pulmón A549, ya sea se infectaron con partículas de virus NG-347 o EnAd o se jedaran sin infectar, se co-cultivaron con las células T aisladas a partir de donadores de PBMC humano. Se valoró la activación de la célula T analizando los marcadores de activación de superficie de la célula (por citometría de flujo) y secreción de la citocina estimuladora, IFN γ (por análisis ELISA de

sobrenadantes celulares).

Se sembraron las células A549 en placas de 12 cavidades a una densidad de 5×10^5 células/cavidad. Las placas se incubaron por 18 horas, 37°C , 5% de CO_2 , antes que las
5 células sean ya sea infectada con 10 partículas de virus EnAd o NG-347 por célula (ppc) o se dejaron sin infectar. A 24 horas después de la infección, las células T $\text{CD}3^{+}$ aisladas por selección negativa de PBMCs (MACs) se agregaron a las monocapas de la célula A549 a una relación de 5 células T:1
10 célula de tumor. El co-cultivo se llevó a cabo por 48 horas antes que los sobrenadantes celulares se recolecten por análisis ELISA y células de tumor y las células T se recolectaron por análisis de citometría de flujo de conformidad con los métodos detallados en EG 15. Las células
15 recolectadas se tiñeron con anticuerpos directamente conjugados: anti- $\text{CD}3$ conjugado a BV605 y anti- $\text{CD}69$ conjugado a BV421. Una muestra celulares de cada condición de co-cultivo también se tiñó con anticuerpos de control de isotipo relevante. Todos los teñidos se llevaron a cabo en
20 amortiguador FACS en un volumen total de $50 \mu\text{l}$ /cavidad por 15 minutos, 4°C . Las células después se lavaron con amortiguador FACS ($200 \mu\text{l}$) antes de la resuspensión en $200 \mu\text{l}$ de amortiguador FACS y análisis por citometría de flujo (Attune).

Sobrerregulación del marcador de activación de la célula T, CD69

El análisis de citometría de flujo de la activación celular T se valoró por expresión del marcador de activación de la célula T CD69 en células sencillas, CD3', vivas. Estos datos mostraron que el número de CD69 que expresan las células T fue significativamente mayor para las células T cultivadas con células A549 infectadas con NG-347 que EnAd o controles sin infectar (Figura 24).

Secreción de citocina IFN γ estimuladora

Para detección de la expresión IL-2 o IFN γ , se diluyeron los sobrenadantes del co-cultivo en 5% de amortiguador de ensayo BSA/PBS (en un intervalo de 1:1000 a 1:10000) y se llevó a cabo el ELISA usando el kit de IFN gama humano Ready set go (Affymetrix) de conformidad con el protocolo del fabricante.

Se determinó la concentración de IFN γ secretado interpolando de la curva estándar. La expresión de IFN γ puede únicamente ser detectada en los sobrenadantes del co-cultivo usando células A549 infectadas con NG-347 y no es detectable en ya sea el EnAd, o controles sin tratar (Figura 25).

Ejemplo 18: Producción de virus EnAd que expresa el antígeno CD80 que activa la célula T y un anticuerpo del fragmento Fv de cadena sencilla anclada a la membrana a la cadena ϵ del complejo CD3 humano (CD3 ϵ)

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar los plásmidos pNG-348A por inserción directa de un casete que codifica el antígeno CD80 que activa la célula T (SEQ ID NO: 11) y una forma quimérica anclada a la membrana del CD3e anti-humano Fv de cadena sencilla con una etiqueta V5 C-terminal (SEQ ID NO: 99). El casete pNG-348 contiene; una secuencia aceptora de empalme 5' corto (SEQ ID NO: 2); cADN ScFv CD3e anti-humano; una etiqueta V5 C-terminal (SEQ ID NO: 100); una secuencia de péptido P2A de auto-escisión muy eficiente (SEQ ID NO: 7); secuencia de cADN CD80 humano y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). Se muestra en la Figura 26A un esquemático del casete de transgen NG-3484. La construcción del plásmido se confirmó por secuenciamiento de ADN.

15 **Producción y caracterización de virus**

El plásmido pNG-348A se linealizó por digestión de restricción con la enzima AclI para producir el genoma del virus NG-348A (SEQ ID NO: 101). El virus NG-348A se amplificó y purificó de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 1.

Ejemplo 19. Producción de virus EnAd de un anticuerpo de fragmento Fv de cadena sencilla anclada a la membrana a la cadena ϵ del complejo CD3 humano (CD3 ϵ)

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar los plásmidos pNG-420 y pNG-420A por inserción directa de un

casete que codifica una forma quimérica anclada a la membrana del CD3e anti-humano Fv de cadena sencilla con una etiqueta V5 C-terminal (SEQ ID NO: 99) o sin una etiqueta V5 (SEQ ID NO: 15). El casete pNG-420 contiene; una secuencia CAGG
 5 aceptora de empalme 5' corto; cADN scFv CD3e anti-humano y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 5). El casete pNG-420A contiene; una secuencia cagg aceptora de empalme 5' corto; cADN ScFv CD3e anti-humano; una etiqueta V5 C-terminal (SEQ ID NO: 100) y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ
 10 ID NO: 5). Se muestran en la Figura 26B y 26C esquemáticos de los casetes transgen NG-420 y NG-420A. La construcción de cada plásmido se confirmó por secuenciamiento de ADN.

Producción y caracterización de virus

Se linealizaron los plásmidos pNG-420 y pNG-420A
 15 por digestión de restricción con la enzima AclI para producir los genomas del virus NG-420 (SEQ ID NO: 102) y NG-420A (SEQ ID NO: 103). Los virus NG-420 y NG-420A se amplificaron y purificaron de conformidad con los métodos detallados en el Ejemplo 1.

Ejemplo 20

Se cultivaron células de carcinoma de pulmón humanas A549 y células de fibroblasto humanas MRC5 con virus EnAd, NG-347 o NG-348 (a 100 ppc) para comparar la replicación del genoma del virus, la expresión del hexon y
 25 transgen del virus por estos tipos celulares. Después de 72

horas de cultivo, las células ya sea se tiñeron para análisis FACS de marcadores de superficie o sobrenadantes y los lisados celulares preparados para análisis de replicación del genoma del virus (qPCR) o mRNA (RT-qPCR) de expresión de
5 hexon o transgen.

La expresión del genoma del virus y expresión de mRNA de hexon para los dos virus que portan el transgen, NG-347 y NG-348 son equivalentes a aquellos para el virus parenteral, EnAd (Figura 27). Para NG-348 (Figura 28), los
10 niveles de expresión mRNA del transgen CD3-scFv anti-humano son mayores con células de tumor A549, con solamente una señal de nivel bajo para las células MRC5 sin tumor. La expresión de la proteína CD80 en la superficie de las células valorada por FACS se detectó en la mayoría de las células
15 A549 tratadas con NG-348, pero no son detectables en las células MRC5, sin CD80 detectada en ya sea tipo celular dejada sin tratar o tratada con EnAd. De manera similar, el mRNA del transgen CD80 y la expresión de proteína siguiendo el tratamiento con NG-347 selectivamente se detectaron en las
20 células de tumor A549 sin células MRC5 (Figura 29).

Para los cultivos celulares tratados con EnAd y NG-347, se midieron los niveles de mRNA IFN α y MIP1 α y proteínas secretadas en sobrenadantes se midieron por RT-qPCR y ELISAs específicos, respectivamente. Los datos (Figura 30) muestran
25 expresión selectiva de ambos transgenes por células de tumor

A549, sin quimocina MIP1 α detectable o citocina IFN α en los sobrenadantes MRC5.

Ejemplo 21

La selectividad/actividad de los virus EnAd, NG-347
5 y NG-348 con células T humanas se evaluaron cultivando las células T CD3+ aisladas por 3 días con ya sea 500 ppc o 5000 ppc de cada virus. Se valoró la selectividad/actividad por a) análisis de citometría de flujo de las células T teñidas con CD69, CD4, CD80, CD25 y CD3 dirigidos a anticuerpos, b)
10 análisis ELISA de secreción de proteína MIP1 α , IFN α e IFN γ , c) análisis qPCR de replicación del virus y d) análisis RT-qPCR del gen de expresión.

Como se muestra en la Figura 31, las células T no apoyan la replicación del genoma del virus por cualquiera de
15 los virus probados con solamente señales antecedentes en el ensayo RT-qPCR de hexon del virus. Las células de tumor A549 soportan altos niveles de la expresión de mRNA de hexon. Los análisis RT-qPCR para la expresión de mRNA del transgen por las células T mostraron solamente señales antecedentes (<1
20 copia/célula) para CD80 tanto por NG-347 como por NG-348, y una carencia similar de expresión significativa de mRNA anti-CD3-ScFv, a pesar de la alta exposición del virus (5000 ppc). Se detectaron niveles altos expresión de ambos transgenes con células de tumor A549 (10 ppc) tratadas (Figura 32 y 33). La
25 expresión de mRNA del transgen IFN α y MIP1 α también se

detectó selectivamente por células de tumor A549 tratadas (no EnAd) con NG-347 (a 10 ppc) y no por células T tratadas con 5000 ppc (Figura 34). Además, la supresión de proteína en superficie celular CD80 fue únicamente detectable con células A549 no con células T para tanto NG-347 como para NG-348 (Figuras 32 y 33). El tratamiento con EnAd no condujo a la expresión de CD80 por ya sea tipo celular, y muerte celular A549 (como se valoró por absorción de tinte) fue similarmente alto para todos los tres virus; un nivel bajo de muerte celular T no específica se indujo para todos los virus debido a los niveles muy altos de partículas de virus usadas en el experimento (Figuras 32 y 33). Se manera similar el mARN transgen y se obtuvieron los datos de expresión de proteína cuando se usan los virus a 500 ppc (datos no mostrados).

En la ausencia de células de tumor, las células T humanas purificadas no activadas para marcadores CD25 o CD69 de activación sobrerregulada cuando se cultivan con cualquiera de los virus (Tabla 5).

Tabla 5. Carencia de expresión de marcadores CD25 y CD69 de activación por células T de VD3+ humana con 5000 ppc de diferentes virus

	Sin tratar	EnAd	NG-347	NG-348
Células T CD4 CD25+	30.7	24.6	23.4	23.3
Células T CD4 CD69+	0.1	0.4	0.3	0.7
Células T CD8 CD25+	5.9	4.7	4.1	4.1
Células T CD8 CD69+	0.5	1.0	0.9	1.3

5

Ejemplo 22

Se llevó a cabo un experimento de selectividad de virus similar al que se describe en el Ejemplo 21 usando PBMCs humano no separado en lugar de las células T purificadas, incluyendo hacer las mismas valoraciones de actividad. Como con las células T humanas en el ejemplo 21, los datos de este estudio colectivamente demostraron carencia de replicación de virus y expresión del transgen por PBMCs humano. Las figuras 35-37 muestras datos usando 5000 ppc de EnAd, NG-347 o NG-348, pero se generaron datos similares usando 500 ppc (no mostrados). La figura 35 muestra replicación del genoma de virus y expresión de mRNA de hexon y las Figuras 36 y 37 muestran la expresión de mRNA de transgen. Se establecieron los ensayos antecedentes de conformidad con las señales generadas en el ensayo con el virus respectivo ajustado en el medio de cultivo y después procesado en la misma forma como para las muestras de lisado celular. No hay expresión detectable del transgen CD80 en células CD3+ o células CD40+ (células B primarias) en estos cultivos de PBMC con cualquiera de los virus (no mostrado).

25

La activación mediada por partículas del virus NG-347 y NG-348 de células inmunes (monocitos, DCs) en los cultivos PBMC son similares a aquellos de EnAd, como se muestra en las Figuras 38 y 39 para regulación descendente de la expresión CD14 y sobrerregulación de HLA-DR y CD80 de superficie celular endógena, así como también como secreción de MIP1 α e IFN α (nótese que a pesar de que NG-347 codifica tanto estas moléculas en su genoma, no se incrementaron en niveles de producción sobre aquellos por EnAd y NG-348 los cuales no codifican el transgen).

Ejemplo 23

Este ejemplo es similar en diseño a los experimentos en los ejemplos 15-17, 21 y 22, pero en estos estudios, las PBMC humanas o células T purificadas son co-cultivadas con células de tumor A549 pre-tratadas (48 horas) con el virus o fibroblastos MRC5. Las células A549 o MRC5 se trataron con 10 ppc de EnAd, NG-347, NG-348 o se dejaron sin tratar (UTC) y se cultivaron por 48 horas para permitir tiempo suficiente para replicación del virus y cualquier expresión del transgen. Después se agregaron PBMCs o células T a los cultivos y se dejaron por 24 o 48 horas para evaluar la capacidad de las células tratadas con el virus a células T activadas.

La figura 40 muestra datos de replicación de genoma del virus que muestra replicación comparable de los tres

virus en co-cultivo de PBMC o célula T con ambos tipos de células, los niveles de replicación son altos con células de tumor A549 y bajos con fibroblastos MRC5.

Se midió la activación de la célula T por
 5 sobrerregulación de expresión de superficie CD25 y
 desgranulación de la célula T de CD80 efectora, como se midió
 por sobrerregulación de CD107a en la superficie celular, y
 producción de IFN γ medida por teñido de citocina intracelular
 son todos selectivamente estimulado por células A549 tratadas
 10 con NG-348 comparado a EnAd, sin estimulación mediada con co-
 cultivos de MRC (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de citometría de flujo de activación de células T CD3+ humana en co-cultivos de célula T y PBMC con el virus

15

20

25

Células	Tratamiento	%CD25+	%CD8+CD107a	% IFN γ
Células T A549+	No tratado	37.5	0.1	0.1
Células T A549+	EnAd	38.4	0.1	0.2
Células T A549+	NG-348	88.2	17.9	12.0
Células T MRC5+	No tratado	38.8	0.3	0.4
Células T MRC5+	EnAd	38.9	0.2	0.4
Células T MRC5+	NG-346	39.1	0.3	0.3
PBMCs A549+	No tratado	28.3	ND	ND
PBMCs A549+	EnAd	29.4	ND	ND
PBMCs A549+	NG-348	73.7	ND	ND
PBMCs MRC5+	No tratado	23.0	ND	ND
PBMCs MRC5+	EnAd	23.3	ND	ND
PBMCs MRC5+	NG-348	21.7	ND	ND

ND = No determinado

También se cuantificó la secreción de IFN γ en sobrenadantes de co-cultivo por ELISA. Los datos (Figura 41) demuestran de manera similar la activación selectiva de
 5 células T co-cultivadas con células tumorales A549 tratadas con NG-348 no fibroblastos MRC5, con ya sea células T purificadas o PBMCs usadas en los ensayos.

La capacidad de NG-347 para activar células T también se evaluó midiendo los niveles de células T a partir
 10 de co-cultivos de ya sea células T purificadas o PBMCs con células tumorales A549 o fibroblastos MRC5. Como se muestra en la Tabla Z, un pequeño mejoramiento en células T positivas CD69 se observó con el tratamiento de NG-347 de células tumorales A549 comparado con EnAd, el cual el mismo conduce a
 15 regulación ascendente de este marcador de activación temprano. Estos efectos no fueron vistos en co-cultivos de MRC5. No se detectó la expresión de CD80 en las células T (no mostradas).

Tabla 7. Expresión de CD69 en células T a partir de
 20 **co-cultivos tratados con NG-347 o EnAd**

5

Células	Tratamiento	%CD69+
A549 + células T	No tratada	2.1
A549 + células T	EnAd	18.7
A549 + células T	NG-348	35.0
MRC5 + células T	células T	3.8
MRC5 + células T	EnAd	3.6
MRC5 + células T	NG-348	4.4
A549 + PBMCs	células T	1.2
A549 + PBMCs	EnAd	19.1
A549 + PBMCs	NG-348	28.7
MRC5 + PBMCs	células T	2.6
MRC5 + PBMCs	EnAd	2.7
MRC5 + PBMCs	NG-348	3.9

10

En un experimento separado, células A549 tratadas con NG-347 y co-cultivadas con células T CD3+ humanas conducen a la regulación ascendente del marcador de activación de CD69 en las células T y secreción de IFN γ (véase Figuras 24 y 25).

15

Ejemplo 24

Células monocíticas CD14+ se aislaron a partir de PBMCs por separación de perillas magnéticas recubiertas por anticuerpo y cultivadas con IL-4 humana y GM-CSF para diferenciarlas en células dendríticas. Después de 3 días de cultivo, las células se trataron con EnAd, NG-347 o NG-348 a 5000 ppc o se dejaron sin tratar. Como un control de activación positivo, algunas células se estimularon con LPS. Dos días después, los sobrenadantes se tomaron para ELISAs de citocina y las células se tiñeron para expresión del marcador

25

de activación de la superficie y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la tabla 8, todos los virus inducen regulación ascendente de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, indicando que este efecto de
 5 activación de células inmunes innatas mediadas por partículas identificadas fue no alterado por la incorporación del transgen en los genomas NG-347 y NG-348. Todos los virus también estimularon la secreción de niveles similares de MIP1 α e IFN α (Figura 42).

10 **Tabla 8. Activación mediada por partículas de células dendríticas humanas por EnAd, NG-347 y NG-348**

Tratamiento DC	% CD80 ⁺	% CD86 ⁺
No tratada	3.0	10.4
EnAd	81.6	99.3
NG-347	82.1	99.4
NG-348	62.5	99.5
control positivo LPS	97.5	98.5

15

Ejemplo 25

En una serie de experimentos, se usaron células JurkatDual en co-cultivos con células tumorales como un
 20 ensayo reportero de activación de células T para evaluar la funcionalidad de la expresión del transgen por virus NG-347, NG-348 y NG-420, con EnAd que sirve como un control negativo. Las células JurkatDual expresan establemente dos genes reporteros diferentes: un gen reportero NF κ B que produce una
 25 forma secretada de luciferasa la cual es responsable de la

señalización mediante el complejo del receptor de células T y un gen reportero de fosfatasa alcalina secretada sensible a $\text{IFN}\alpha$ (SEAP). Las células A549 se pre-cultivaron con virus a 10^6 ppc por dos días, y después las células JurkatDual se
5 agregaron para co-cultivo durante la noche (18-24h) y después los sobrenadantes se recolectaron por ensayo de luciferasa y actividades de SEAP. Como se muestra en la Figura 43, células A549 infectadas con NG-347 respectivamente inducen la producción de SEAP, la cual se alinea con su producción de
10 $\text{IFN}\alpha$ (véase Figura 11) pero no induce actividad de luciferasa. Por el contrario, NG-348 la cual expresa la membrana anti-CD3-ScFv para activar el complejo receptor de células T inducida por luciferasa, pero no por SEAP.

En otro experimento, células de carcinoma de pulmón
15 A549 y HCT-116, HT-29 y células de carcinoma de colon DLD se pre-cultivaron por 48 horas con 10^6 ppc de virus EnAd, NG-347, NG-348 o NG-420 antes de co-cultivar con células JurkatDual durante la noche, con sobrenadantes probados para determinar los niveles de luciferasa para indicar el nivel de activación
20 inducido. Como se muestra en la Figura 44, todos los cuatro tipos de células tumorales se cultivaron con virus NG-348 o NG-420, los cuales codifican anti-CD3-ScFv de la superficie celular, activan las células JurkatDual mientras EnAd y NG-347 no, con niveles de luciferasa similares a aquellos de
25 controles de células tumorales no infectadas (UIC).

En otro experimento, células tumorales A549 o HT-29 se pre-cultivaron con diferentes cantidades de ya sea NG-348 o NG-420 antes de agregar las células JurkatDual y se midió su secreción de luciferasa. Los datos en la Figura 45 muestran que la activación de la actividad de NFκB en células JurkatDual es dependiente de la dosis del virus usado para tratar las células tumorales.

Ejemplo 26

Se comparó farmacocinética *in vivo*, biodistribución y actividades de inducción de citocina sistémicas mediadas por partículas de EnAd y NG-348 después de la dosificación IV en ratones CD1 inmunocompetentes, los ratones se dosificaron intravenosamente con partículas 5×10^9 de ya sea EnAd o NG-348 y se mezclaron 2, 10, 30, 60 y 120 minutos post-dosificación. La sangre completa se extrajo de ADN y se analizó por qPCR para determinar los niveles del genoma del virus (Figura 46). La separación de ambos virus de la sangre siguió cinéticas similares. De manera similar, la inducción de la respuesta de citocina MCP-1 (una medida de la activación mediada por partículas de inmune innatas tal como células Kupffer hepáticas), también fue similar para ambos virus, como fueron los patrones de biodistribución tisular (Figura 46).

Ejemplo 27

Ratones CB17 SCID se implantaron subcutáneamente con células HCT116 e inyectaron intratumoralmente (IT) o

intravenosamente (IV) con virus EnAd, NG-347 o NG-348 (5x10⁹ partículas de virus), o control, una vez que los tumores fueron mayores de 70mm³. Para los ratones dosificados IV, se tomaron muestras de sangre de tres ratones de cada grupo 3, 15 y 30 minutos después de la dosificación IV, se extrajo el ADN y el nivel de los genomas del virus en la sangre se evaluó por qPCR (análisis de farmacocinética [PK]). Los datos (Figura 47) muestra que NG-347 y NG-348 tienen PK a EnAd similares (y a cada una de la otra). Después de 6 horas, tumores, hígados, pulmones y vasos se sometieron a resección a partir de 3 ratones de cada grupo. Los tejidos homogeneizados fueron extraídos de ADN y analizados para determinar el nivel de los genomas del virus por qPCR (análisis de biodistribución). Los datos (Figura 48A) muestran la biodistribución del tejido similar para los tres virus. Después de 7 días o 14-21 días, los tumores fueron escindidos a partir de tres ratones de cada grupo y homogeneizados para producir un lisado tumoral el cual se usó para preparar tanto ADN como ARN. El nivel de genomas de virus en los tumores en los dos puntos de tiempo se midió por análisis de qPCR del ADN extraído. Los datos (Figura 48B) muestran que los tumores a partir de ratones dosificados IV e IT tiene niveles de genomas de virus superiores que la cantidad de virus dosificado, indicando la replicación de virus en el tejido, con dosificación IT proporcionando

niveles superiores de genoma que IV en el día 7, pero ambos siendo de manera similar en el marco de tiempo de 14-21 días. Todos los tres virus se replicaron a niveles similares.

De manera similar, los niveles del mRNA del hexón
5 del virus en lisados tumorales detectados por RT-qPCR fueron comparables entre EnAd, NG-347 y NG-348 en ambos puntos de tiempo probado (Figuras 49 y 50). Niveles similares de mRNA anti-CD3-ScFv y CD80 se detectaron en ambos puntos de tiempo y ambas rutas de dosificación para el tratamiento con NG-348,
10 con solamente lecturas de antecedente de ensayo con dosificación de EnAd (Figura 50 y 51). Los niveles de mRNA MIP1 α e IFN α también fueron selectivamente detectados después de la dosificación de NG-347, ya sea IT o IV (Figura 52).

Los niveles de la proteína CD80 codificados por
15 tanto NG-347 como NG-348, y proteína MIP1 α codificada por NG-347 se midieron en lisados tumorales usando ELISAs específico. Los datos en la Figura 53 muestran que después de la dosis del virus IV único, ambas proteínas podrían también ser detectadas selectivamente en extractos tumorales. No se
20 detectó proteína en muestras de sangre a partir de los mismos ratones.

Ejemplo 28

Para evaluar la actividad y dependencia de células tumorales de virus NG-348 *in vivo*, se inyectaron diferentes
25 combinaciones de PBMCs (5×10^7 células), células tumorales

humanas A549 (5×10^6) y ya sea EnAd o NG-348 (a 5×10^9 ppc) se inyectaron en el peritoneo de ratones SCID-beige inmunodeficientes, con virus o control (salina) siendo dosificados dentro de 15 minutos después de la inyección de las células. Después de 3 días, la cavidad peritoneal se lavó con 5 mL de salina y las células recubiertas se analizaron por análisis citométrico de flujo con un panel de marcadores de activación de células T (CD25, CD69 y HLA-DR) para evaluar los niveles de activación de células T, después de la activación en la población de células T CD3+. Los datos a partir de dos experimentos separados (Tabla 9) demuestran que NG-348 conduce selectivamente a la activación de células T humanas *in vivo* en una manera dependiente de la célula tumoral.

15

Tabla 9.

Activación *in vivo* de células T humanas en ratones que portan tumor A549 por NG-348

20

25

5

10

15

20

25

Grupo	Virus	Tumor	N	% CD25 ⁺	% CD69 ⁺	%DR ⁺	% CD25 ⁺ ,C D69 ⁺	% CD25 ⁺ ,D R ⁺
Experimento 1								
1	EnAd	Salina	2	1.9, 2.3	1.6, 3.0	7.7, 9.1	0.2, 0.5	0.3, 0.6
2	EnAd	células A549 5x10 ⁶	2	4.2, 2.9	6.2, 5.5	8.4, 8.4	0.8, 0.3	1.4, 0.4
3	NG-348	Salina	1	3.4	2.6	9.2	0.5	0.8
4	NG-348	células A549 5x10 ⁶	2	35.8, 36.6	50.4, 42.2	26.3, 19.2	22.4, 18.0	16.4, 12.2
Experimento 2								
1	Salina	Salina	1	25.6	37.3	14.8	14.1	7.08
2	EnAd	Salina	2	6.5, 7.3	17.8, 18.2	5.50, 6.1	3.58, 3.46	1.01, 1.49
3	NG-348	Salina	2	10.2, 6.5	26.7, 18.3	7.7, 6.0	6.73, 3.61	2.16, 1.44
4	Salina	células A549 5x10 ⁶	2	28.4, 22.7	54.4, 51.1	13.3 15.0	22.3 17.5	8.54, 7.72
5	EnAd	células A549 5x10 ⁶	1	13.2	29.4	5.1	7.84	1.62
6	NG-348	células A549 5x10 ⁶	3	34.4, 29.6, 56.4	58.9, 59.2, 85.0	12.5 9.8, 17.0	27.2, 23.3, 52.7	9.07 7.5, 14.2