

ADENOVIRUS QUE EXPRESA UN ACTIVADOR BIESPECIFICO DE LINFOCITOS T ANTI-CD3 Y FAP Y LAS PROTEÍNAS CXCL10, CXCL9 E IFNA

La presente divulgación se refiere a un adenovirus modificado, en particular Enadenotucirev (EnAd), armado con activador biespecífico de linfocitos T anti FAP, una composición, tal como una formulación farmacéutica que comprende el adenovirus, el uso del virus y las formulaciones de virus, particularmente en tratamiento, especialmente en el tratamiento contra el cáncer. La divulgación también se extiende a procesos para preparar el virus y ADN que lo codifica. La divulgación también se extiende a secuencias novedosas proporcionadas en el listado de secuencias en conjunto con la divulgación técnica en la presente, por ejemplo, en donde el virus ejemplificado se reemplaza con, por ejemplo, un casete alternativo o virus alternativo proporcionado en el listado de secuencias.

ANTECEDENTES

El cáncer sigue siendo una enorme carga social para la sociedad en lo que respecta a las dificultades y al sufrimiento de los pacientes y sus seres queridos, y también en lo que respecta al alto costo financiero que implica tratar, cuidar y brindar apoyo a los pacientes.

El estroma que rodea las células cancerosas es una protección física en el sentido de que puede tener la función de atrapar las células inmunitarias enviadas para combatir el tumor. Además, el estroma protege el microentorno hipóxico del tumor, el cual es permisivo y está optimizado para el crecimiento del tumor. Existen algunas teorías de que las células en el estroma son una fuente de energía en el tumor.

Un gran componente del estroma tumoral son los fibroblastos, que se han corrompido para cumplir el propósito del cáncer. Otras células que se infiltran en el estroma son los macrófagos asociados a tumores (TAM), que son macrófagos tipo 2 (M2) que pueden promover el crecimiento tumoral al segregar citocinas y quimiocinas, tales como IL-10, que reducen las respuestas inmunitarias.

El direccionamiento al estroma tumoral es especialmente difícil porque las células que conforman el entorno son células de tejido conectivo o inmunitarias "nativas", que se encuentran en todo el cuerpo. Por lo tanto, dirigir agentes terapéuticos a estas células puede conducir a graves efectos secundarios.

Por lo tanto, existe la necesidad de un método mejorado para administrar un activador biespecífico de linfocitos T directamente a las células tumorales, donde

pueda proporcionar el máximo beneficio terapéutico, en particular la administración a las células tumorales rodeadas por fibroblastos estromales.

WO2018/041838 y WO2018/041827, ambas incorporadas en la presente por referencia, divulgan ciertos adenovirus que codifican activadores biespecíficos de linfocitos T. Sin embargo, sería útil aumentar la actividad del activador biespecífico de linfocitos T codificado en el virus mediante la incorporación de citocinas de activación. Se pueden incorporar dos citocinas colocadas conjuntamente con el activador biespecífico de linfocitos T sin mucha dificultad. Sin embargo, cuando se colocan tres citocinas conjuntamente con el activador biespecífico de linfocitos T, la naturaleza de los genes comienza a tener un impacto sobre la expresión del activador biespecífico de linfocitos T. Los presentes inventores elaboraron el virus NG-615 con 4 transgenes, como se muestra en la Figura 1. Sin embargo, se redujo la expresión del activador biespecífico de linfocitos T. De manera sorprendente, el virus NG-641, en donde se cambiaron dos de las citocinas (en comparación con NG-615), muestra una buena actividad, que incluye una buena expresión del activador biespecífico de linfocitos T. Por ende, parece que los cuatro transgenes juntos son compatibles con estar de manera conjunta en el virus.

La presente invención reivindicada se refiere a un virus que admite dichos cuatro transgenes colocados entre la fibra, L5 y la región E4.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Los siguientes párrafos son una síntesis de la presente divulgación:

1. Un adenovirus que comprende una secuencia de la Fórmula (I):

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

en donde:

B_1 es un enlace o comprende: E1A, E1B o E1A-E1B;

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

B_2 es un enlace o comprende: E3;

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 casete de transgén que contiene cuatro transgenes, en donde dichos genes codifican un activador biespecífico de linfocitos T anti FAP, CXL10, CXL9, e IFN;

B_3 es un enlace o comprende: E4.

2. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 1, en donde el activador biespecífico

de linfocitos T anti FAP codificado comprende un anti-CD3 mostrado en SEQ ID NO: 5 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, tal como SEQ ID NO: 5.

3. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 1 o 2, en donde el activador biespecífico de linfocitos T anti FAP comprende un anti-FAP mostrado en SEQ ID NO: 9 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, tal como SEQ ID NO: 9.

4. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 1, en donde el activador biespecífico de linfocitos T anti FAP codificado comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76 o una secuencia al menos 95 % idéntica a cualquiera de estas.

5. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 4, en donde el casete de transgén codifica CXL10 como se muestra en SEQ ID NO: 100 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, tal como SEQ ID NO: 100.

6. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 5, en donde el casete de transgén codifica CXCL9 como se muestra en SEQ ID NO: 99 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, tal como SEQ ID NO: 99.

7. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 6, en donde el casete de transgén codifica IFN α como se muestra en SEQ ID NO: 98 o una secuencia al menos 95 % idéntica a esta, tal como SEQ ID NO: 98.

8. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 7, en donde los transgenes están ligados operativamente.

9. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 8, en donde los transgenes están separados por 3 péptidos de autoescisión de alta eficiencia diferentes.

10. Un adenovirus de acuerdo con el párrafo 9, en donde los péptidos de autoescisión se seleccionan independientemente de E2A, F2A, P2A y T2A.

11. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 10, en donde el orden relativo de los transgenes de L5 a E4 es activador biespecífico de linfocitos T anti FAP, CXL10, CXCL9 e IFN α , por ejemplo, como se muestra al respecto de NG-641 en la Figura 1.

12. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 11, en donde el casete de transgén tiene una secuencia de polinucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 95 o un polinucleótido que codifica la misma secuencia de aminoácidos, en particular SEQ ID NO: 95.

13. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 12, en donde el adenovirus comprende SEQ ID NO: 84.

14. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 13, en donde el adenovirus es competente para la replicación.
15. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 14, en donde el adenovirus es oncolítico.
16. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 15, en donde el virus tiene un hexón y fibra de Ad11.
17. Una composición farmacéutica que comprende un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16 y un excipiente, diluyente o portador.
18. Un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16, o una composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 17, para usar en tratamiento, por ejemplo, en el tratamiento contra el cáncer.
19. Un método para tratar un paciente que comprende administrar un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16 o una composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 17.
20. El uso de un adenovirus de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 16, o una composición farmacéutica de acuerdo con el párrafo 17, para la producción de un medicamento para el tratamiento contra el cáncer.

En una forma de realización, el activador biespecífico de linfocitos T o los activadores biespecíficos de linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación no comprenden un dominio transmembrana y, por lo tanto, no se expresan en la superficie de la célula cancerosa, sino que comprenden más bien una secuencia de señal para facilitar la liberación de la molécula de activador biespecífico de linfocitos T de la célula cancerosa infectada por el virus.

En una forma de realización, el casete de transgén está bajo el control de un promotor endógeno, por ejemplo, el promotor tardío principal.

Ventajosamente, los presentes inventores han descubierto que el armado de un adenovirus con una molécula de activador biespecífico de linfocitos T permite que la molécula del fragmento del anticuerpo biespecífico se sume a la capacidad del adenovirus de infectar selectivamente las células cancerosas, lo que permite la administración dirigida del activador biespecífico de linfocitos T a las células tumorales.

Ventajosamente, los activadores biespecíficos de linfocitos T son pequeños y pueden producirse en células de mamíferos. Por lo tanto, una vez infectadas por los adenovirus de la presente divulgación, las moléculas de activador biespecífico de linfocitos T son sintetizadas por células tumorales y son segregadas, y pueden actuar localmente, propagándose más allá del espacio inmediato del virus. Por lo tanto, esto

permite que el activador biespecífico de linfocitos T se propague más allá del sitio inmediato de infección, pero al mismo tiempo limita la propagación del virus mucho más allá del sitio de células tumorales infectadas. Esto minimiza el riesgo de efectos secundarios no deseados.

En una forma de realización, el adenovirus es EnAd. Se ha demostrado que EnAd tiene una actividad oncolítica mejorada en comparación con otras plataformas de adenovirus, por ejemplo, basadas en Ad5. También se ha demostrado que EnAd tiene una alta selectividad para las células de carcinoma derivado del epitelio humano, tales como las células cancerosas de colon, pulmón, vejiga y riñón. Esto lo convierte en un vehículo de administración ideal para las moléculas de activador biespecífico de linfocitos T porque los linfocitos T pueden ser activados por la molécula de activador biespecífico de linfocitos T para atacar las células diana, mientras que EnAd infecta y lisa simultáneamente las células cancerosas. Esto da como resultado un ataque doble en el tumor, lo que tiene un efecto oncolítico sinérgico.

En una forma de realización, el componente anti-CD3 del activador biespecífico de linfocitos T es selectivo para un antígeno seleccionado de CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 δ , en particular CD3 ϵ .

FAP es un antígeno de estroma tumoral. Ventajosamente, las células estromales (células no transformadas) que expresan estos antígenos no se someten al mismo nivel de proceso de mutación-resistencia-selección que las células transformadas. Por lo tanto, en el tratamiento contra el cáncer, el direccionamiento a estas células es más fácil, ya que no son una "diana en movimiento". Además, los tipos de receptores que se encuentran en las células estromales a menudo son comunes en diferentes tipos de cáncer. Por lo tanto, es probable que el direccionamiento a FAP sea eficaz en lo que respecta a múltiples tipos de cáncer.

Ventajosamente, la FAP está regulada de manera ascendente en fibroblastos asociados a tumores. Los fibroblastos son un componente vital de los carcinomas sólidos que sustentan el crecimiento, la invasión y la recuperación de las intervenciones. Por lo general, comprenden un 40-60 % de las células en los carcinomas avanzados. Ventajosamente, los fibroblastos son células genéticamente estables que tienen menos probabilidades de escapar el tratamiento que las células cancerosas. Los fibroblastos activados también son relativamente similares en una variedad de tipos de tumores. Por lo tanto, al activar los linfocitos T para que se dirijan a los fibroblastos asociados a tumores que expresan FAP y los inactiven, los adenovirus de la presente divulgación pueden ayudar a disminuir un espectro de vías

inmunosupresoras, tales como las mediadas por IL-10, TGF β e IDO.

En una forma de realización, BX no es un enlace.

En una forma de realización, el adenovirus es quimérico. En una forma de realización, el adenovirus es oncolítico. En una forma de realización, el adenovirus es quimérico y oncolítico. En una forma de realización, el adenovirus es capaz de replicación. En una forma de realización, el adenovirus es quimérico, oncolítico y capaz de replicación. En una forma de realización, el adenovirus es competente para la replicación. En otra forma de realización, el adenovirus es quimérico, oncolítico y competente para la replicación. En una forma de realización, el adenovirus es deficiente para la replicación, es decir, es un vector.

En una forma de realización, BX comprende un transgén o casete de transgén, en particular un casete de transgén que codifica un activador biespecífico de linfocitos T. En una forma de realización, el transgén adicional está bajo el control de un promotor exógeno, tal como un promotor de CMV.

Utilizar un promotor exógeno puede ser ventajoso en algunas formas de realización porque puede expresar de forma fuerte y constitutiva el anticuerpo o fragmento, lo que puede ser particularmente útil en algunas situaciones, por ejemplo, cuando el paciente tiene cáncer muy generalizado. Ventajosamente, el uso de un promotor exógeno constitutivo da como resultado la transcripción continua del transgén, lo cual puede ser deseable en ciertos casos.

En una forma de realización, el casete de transgén comprende una secuencia de Kozak, por ejemplo, al comienzo de la secuencia codificante, en particular en el extremo L5 del casete de transgén.

En una forma de realización, el casete de transgén comprende además una secuencia de poliadenilación, por ejemplo, al final de la secuencia, en particular al final de la región E4 del casete de transgén.

En una forma de realización, el casete de transgén tiene la disposición mostrada en la Figura 1, tal como el virus NG-641.

En una forma de realización, la molécula de activador biespecífico de linfocitos T tiene una semivida corta, por ejemplo, de 48 horas o menos.

En una forma de realización, el adenovirus solo contiene un activador biespecífico de linfocitos T.

En otra forma de realización, el adenovirus contiene dos activadores biespecíficos de linfocitos T.

En una forma de realización, el activador biespecífico de linfocitos T anti FAP

comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 11, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a esta.

En una forma de realización, el activador biespecífico de linfocitos T anti FAP comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a esta.

En una forma de realización, la porción anti-CD3 del activador biespecífico de linfocitos T anti FAP comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 6, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a esta.

En una forma de realización, la porción anti-CD3 del activador biespecífico de linfocitos T anti FAP comprende un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 7, o una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a esta.

En una forma de realización, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia establecida en SEQ ID NO: 34 o 35, o un polinucleótido que codifica la misma secuencia de aminoácidos scFv, en particular SEQ ID NO: 34.

En una forma de realización, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia establecida en SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 o una secuencia de polinucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos.

En una forma de realización, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia establecida en SEQ ID NO: 90 o un polinucleótido que codifica la misma secuencia de aminoácidos.

En una forma de realización, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia establecida en SEQ ID NO: 91 o un polinucleótido que codifica la misma secuencia de aminoácidos.

En una forma de realización, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende una secuencia establecida en SEQ ID NO: 92 o un polinucleótido que codifica la misma secuencia de aminoácidos.

La persona del oficio de nivel medio es consciente de que existe una redundancia en el código de ADN, por lo que la presente divulgación se extiende a EnAd o Ad11 que codifica un activador biespecífico de linfocitos T con un aminoácido divulgado en la presente.

Una etiqueta de afinidad His del terminal C (tal como una etiqueta deca o hexa-his) es útil para la purificación del activador biespecífico de linfocitos T o adenovirus. Sin embargo, es opcional y se puede excluir, por ejemplo, en el producto final. La persona del oficio de nivel medio es consciente de que se pueden usar otras etiquetas de afinidad que no sean deca-His y de que también se pueden excluir sin afectar la función biológica del activador biespecífico de linfocitos T o adenovirus.

Por consiguiente, en una forma de realización, el activador biespecífico de linfocitos T comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 1 o 2 pero excluye la etiqueta de afinidad His en el extremo terminal C de la secuencia, tal como SEQ ID NO: 61 o 62.

La exclusión de la etiqueta de afinidad deca-His se extiende además a todas las demás secuencias divulgadas en la presente que comprenden la etiqueta de afinidad deca-His, es decir, la presente divulgación incluye las mismas secuencias de aminoácidos o de ADN que carecen de la etiqueta His del terminal C.

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende un adenovirus como se describe en la presente y un diluyente o portador.

En un aspecto, se proporciona un método para tratar a un paciente que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un adenovirus o una composición como se describe en la presente.

En una forma de realización, el método es para el tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, un cáncer epitelial, en particular un tumor sólido.

En una forma de realización, se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar un virus de acuerdo con la presente divulgación en combinación con un inhibidor del punto de control (tal como un inhibidor de PD-1 o PDL1), particularmente en donde el inhibidor del punto de control está codificando en el virus.

En una forma de realización, se proporciona un método de tratamiento que comprende administrar un virus de acuerdo con la presente divulgación que NO está en combinación con un inhibidor del punto de control (por ejemplo, como se enumera en otra parte de la presente tal como un inhibidor de PD-1 o PDL1), particularmente en donde el inhibidor del punto de control no está codificando en el virus.

Los activadores biespecíficos de linfocitos T codificados por el virus de acuerdo con la presente divulgación tienen la capacidad de potenciar la citotoxicidad del virus.

Sorprendentemente, los activadores biespecíficos de linfocitos T codificados por un virus de acuerdo con la presente divulgación pueden activar los linfocitos CD4+

y/o linfocitos CD8+, por ejemplo, incluso los linfocitos en el entorno supresor del tumor, que incluyen linfocitos T en el entorno fluido, tal como ascitis, del tumor.

Ventajosamente, los activadores biespecíficos de linfocitos T codificados por un virus de acuerdo con la presente divulgación pueden activar los linfocitos T citotóxicos, por ejemplo, incluso los linfocitos T en el entorno supresor del tumor, que incluyen linfocitos T en el entorno fluido, como ascitis, del tumor.

Aún más sorprendentemente, los activadores biespecíficos de linfocitos T codificados por un virus de acuerdo con la presente divulgación son capaces de estimular (activar) la proliferación de linfocitos T.

Los virus que codifican activadores biespecíficos de linfocitos T de acuerdo con la presente divulgación parecen ser capaces de evitar, superar o revertir el microentorno inmunosupresor del tumor.

En una forma de realización, la activación de linfocitos T da como resultado una regulación ascendente de un marcador de linfocitos T, por ejemplo, CD25.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se usa en la presente, célula inmunitaria es una célula con un papel funcional en el sistema inmunitario, que incluye (entre otros) macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, linfocitos, tales como linfocitos T (particularmente linfocitos T y células NKT).

Como se usa en la presente, sitio de fijación al antígeno se refiere a una porción de la molécula, que comprende un par de regiones variables, particularmente un par cognado que interactúa específicamente con el antígeno diana.

Específicamente, como se usa en la presente, se pretende hacer referencia a un sitio de fijación que solo reconoce el antígeno para el que es específico o un sitio de fijación que tiene una afinidad de fijación significativamente mayor al antígeno para el cual es específico en comparación con la afinidad a los antígenos para los que es no específico, por ejemplo, una afinidad de fijación 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces mayor. La afinidad puede medirse mediante técnicas tales como BIAcore.

Como se usa en la presente, molécula de anticuerpo biespecífico se refiere a una molécula con dos dominios de fijación a antígeno, que pueden fijar los mismos antígenos o diferentes. Un activador biespecífico de linfocitos T es una subclase de moléculas de anticuerpos biespecíficos.

Como se usa en la presente, activador biespecífico de linfocitos T se refiere a un activador biespecífico de linfocitos T, en particular, que comprende un dominio de fijación anti-CD3 y un dominio de fijación adicional, en este caso un dominio de fijación

anti-FAP. En líneas generales, los dominios de fijación están en forma de un scFv. Se muestra una representación diagramática de un activador biespecífico de linfocitos T en la Figura 12.

Por ende, activador biespecífico de linfocitos T, como se usa en la presente, se refiere a una clase de anticuerpos monoclonales biespecíficos artificiales que comprenden 2 scFv de anticuerpos diferentes o secuencias de aminoácidos de 4 genes diferentes en una única cadena de péptidos de alrededor de 55 KDa. Uno de los scFv es específico para una célula inmunitaria, tal como un antígeno de linfocitos T, tal como el receptor CD3, expresado en la superficie de los linfocitos T. Por lo general, el otro scFv, en el estado de la técnica, se fija a una célula tumoral a través de una molécula específica de tumor. Por consiguiente, los activadores biespecíficos de linfocitos T pueden formar un enlace entre los linfocitos T y las células tumorales en virtud de sus especificidades para un antígeno en el linfocito T y un antígeno en la célula tumoral. Esto conduce a la activación de linfocitos T y provoca que los linfocitos T ejerzan sus efectos citotóxicos en las células tumorales, independientemente de las moléculas MHC I o coestimuladoras.

En una forma de realización, el activador de linfocitos T está dispuesto en el formato VL1-ligador1-VH1-ligador2-VH2-ligador3-VL2, por ejemplo, mediante el uso de ligadores seleccionados independientemente de las secuencias ligadoras divulgadas en la presente.

En una forma de realización, el ligador de activador biespecífico de linfocitos T está en el rango de 10 a 30 aminoácidos de longitud, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, por ejemplo, un ligador divulgado en la presente.

Como se usa en la presente, estroma o antígeno estromal se refiere a una diana terapéutica de antígeno en el estroma, incluso expresada en la estructura molecular de la matriz del estroma, tal como las moléculas de tejido conectivo o las moléculas asociadas con esta matriz o los antígenos asociados con los componentes celulares del estroma, por ejemplo, expresados en fibroblastos, macrófagos asociados a tumores, células dendríticas, células NK y/o linfocitos T que se han infiltrado en el estroma. Los ejemplos de antígenos estromales incluyen, entre otros, FAP, TGF β , TREM1, IGFBP7, FSP-1, antígeno asociado a fibroblastos, NG2, endosialina (CD248), receptor del factor α de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- α), receptor del factor β de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β) y vimentina. Los antígenos generalmente estromales no se expresan en células cancerosas, es decir, solo se

expresan en células estromales.

El direccionamiento a los fibroblastos puede ocurrir mediante el uso de la proteína de activación de fibroblasto de antígeno (FAP), en particular un anticuerpo específico para FAP que no fija CD26 (ver US2012/0258119 incorporado a la presente por referencia).

Se identificó originalmente FAP como una serina proteasa en fibroblastos estromales reactivos. La clonación molecular posterior reveló que FAP es idéntica a la seprasa, una gelatinasa asociada a la membrana de 170 kDa que se expresa mediante líneas celulares de melanoma. El cADN de longitud completa codificó una proteasa de transmembrana de tipo H de 760 aminoácidos (aa) altamente homóloga a la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) con una identidad de aa de 52 % en toda la secuencia y una identidad de casi 70 % en el dominio catalítico. US5.587.299, incorporada en la presente por referencia, describe moléculas de ácido nucleico que codifican FAP y aplicaciones de estas.

En resumen, FAP se reconoce como una proteína multifuncional que ejecuta sus funciones biológicas de manera dependiente de la célula a través de una combinación de su actividad de la proteasa y su capacidad para formar complejos con otras moléculas de la superficie celular. La sobreexpresión de FAP en líneas celulares epiteliales y fibroblásticas promueve el comportamiento maligno, lo que apunta a la situación clínica, donde los niveles de expresión celular de FAP están correlacionados con un peor resultado clínico.

A través de las moléculas de señalización de paracrina, las células cancerosas activan los fibroblastos estromales e inducen la expresión de FAP, lo que, a su vez, afecta la proliferación, invasión y migración de las células cancerosas. Estudios recientes han demostrado que TGF- β es el factor dominante en la promoción de la expresión de la proteína FAP (Chen, H *et al* (2009) *Exp and Molec Pathology*, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001). FAP se expresa en gran medida en fibroblastos estromales reactivos en 90 % de los carcinomas epiteliales humanos, incluso los de mama, pulmón, colon y ovario (Garin-Chesa, P *et al* (1990) *PNAS USA* 87: 7236-7239). Chen *et al* han demostrado recientemente que FAP α influye en la invasión, proliferación y migración de las células de cáncer de ovario HO-8910PM (Chen, H *et al* (2009) *Exp and Molec Pathology*, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001).

El direccionamiento a FAP puede ocurrir al fijar dicho antígeno y bloquear estéricamente su interacción con moléculas biológicamente relevantes. Alternativa o adicionalmente, al reticular la molécula de FAP con otra molécula de FAP o una

molécula diferente, por ejemplo, linfocitos T. Esta reticulación elevó la visibilidad de las células que llevan la FAP a los sistemas inmunitarios, que luego pueden activarse para su neutralización o destrucción.

El adenovirus de la presente divulgación tiene la capacidad de infectar células tumorales, y en particular se elige para infectar preferentemente células tumorales. La infección por virus oncolítico causa la muerte y la lisis de la célula cancerosa con liberación de partículas virales recién generadas. Se sintetizan transgenes incorporados tales como activadores biespecíficos de linfocitos T y citocinas en linfocitos Th y dichas células tumorales los segregan activamente antes de su muerte. También se liberarán algunas moléculas tras la lisis celular.

Las moléculas de anticuerpos, tales como activadores biespecíficos de linfocitos T, con una semivida corta pueden ser particularmente adecuadas para su uso en la presente divulgación porque esto minimiza los efectos secundarios ya que el cuerpo elimina rápidamente las moléculas si se vuelven disponibles de forma sistémica.

Por lo tanto, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación tiene al menos dos o tres mecanismos para atacar el tumor, que incluyen mecanismos indirectos que socavan el estroma tumoral.

Transgén, como se usa en la presente, se refiere a un gen que se insertó en la secuencia genómica, que es un gen que es no natural con respecto al virus (exógeno) o no se encuentra normalmente en esa ubicación particular en el virus. En la técnica se conocen, y en la presente se analizan, ejemplos de transgenes. Como se usa en la presente, transgén incluye también un fragmento funcional del gen que es una porción del gen que, cuando se inserta, es adecuada para llevar a cabo la función o la mayor parte de la función del gen de longitud completa.

Transgén y secuencia codificante se usan indistintamente en la presente en el contexto de insertos en el genoma viral, a menos que el contexto indique lo contrario. Como se usa en la presente, secuencia codificante significa, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica un ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional. Por lo general, la secuencia codificante es cADN para el transgén que codifica el ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional de interés. Más adelante se describen ARN, péptidos, polipéptidos y proteínas funcionales de interés.

Es evidente que el genoma del virus contiene secuencias codificantes de ADN. Los genes endógenos (genes naturales) en la secuencia genómica del virus no se consideran un transgén, dentro del contexto de la presente memoria descriptiva, a

menos que se hayan modificado mediante técnicas recombinantes a fin de que estén en una ubicación no natural o en un entorno no natural.

En una forma de realización, transgén, como se usa en la presente, se refiere a un segmento de ADN que contiene un gen o secuencia de cADN que se aisló de un organismo y se introduce en un organismo diferente, es decir, el virus de la presente divulgación. En una forma de realización, este segmento no nativo de ADN puede retener la capacidad de producir ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional.

Por lo tanto, en una forma de realización, el transgén insertado codifica una proteína, polipéptido o péptido humano o humanizado.

Como se usa en la presente, ligado operativamente se refiere a que los transgenes están asociados con los elementos reguladores necesarios para permitir que los genes sean funcionales, es decir, para permitir que los genes se expresen mediante la maquinaria celular una vez que el virus esté dentro de la célula.

En una o más formas de realización, el casete está dispuesto como se muestra en la una o más de las Figuras o los ejemplos.

Como se usa en la presente, casete de transgén se refiere a una secuencia de ADN que codifica uno o más transgenes en forma de una o más secuencias codificantes y uno o más elementos reguladores.

Un casete de transgén puede codificar una o más secuencias de mRNA monocistrónico y/o policistrónico.

En una forma de realización, el transgén o casete de transgén codifica un mRNA monocistrónico o policistrónico, y, por ejemplo, el casete es adecuado para la inserción en el genoma de adenovirus en una ubicación bajo el control de un promotor endógeno o promotor exógeno o combinación de estos.

Como se usa en la presente, mRNA monocistrónico se refiere a una molécula de mRNA que codifica un único ARN, péptido, polipéptido o proteína funcional.

En una forma de realización, el casete de transgén codifica el mRNA monocistrónico.

En una forma de realización, el casete de transgén, en el contexto de un casete que codifica mRNA monocistrónico, significa un segmento de ADN que contiene opcionalmente un promotor exógeno (que es una secuencia reguladora que determinará dónde y cuándo está activo el transgén) o un sitio de empalme (que es una secuencia reguladora que determina cuándo el espliceosoma escindirá una molécula de mRNA) y una secuencia codificante (es decir, el transgén), generalmente derivada del cADN para la proteína de interés, que contiene opcionalmente una secuencia de

señal de poliA y una secuencia terminadora.

En una forma de realización, el casete de transgén puede codificar una o más secuencias de mRNA policistrónico.

Como se usa en la presente, mRNA policistrónico se refiere a una molécula de mRNA que codifica dos o más ARN, péptidos o proteínas funcionales o una combinación de estos. En una forma de realización, el casete de transgén codifica un mRNA policistrónico.

En una forma de realización, casete de transgén, en el contexto de un casete que codifica mRNA policistrónico, incluye un segmento de ADN que contiene opcionalmente un promotor exógeno (que es una secuencia reguladora que determinará dónde y cuándo está activo el transgén) o un sitio de empalme (que es una secuencia reguladora que determina cuándo el espliceosoma escindirá una molécula de mRNA) y dos o más secuencias codificantes (es decir, los transgenes), generalmente derivadas del cADN para la proteína o péptido de interés, por ejemplo, en donde cada secuencia codificante esta separada o bien por una IRES o bien por un péptido 2A. Después de la última secuencia codificante a transcribir, el casete puede contener opcionalmente una secuencia de poliA y una secuencia terminadora.

En una forma de realización, el casete de transgén codifica un mRNA monocistrónico seguido de un mRNA policistrónico. En otra forma de realización, el casete de transgén codifica un mRNA policistrónico seguido de un mRNA monocistrónico.

En una forma de realización, el adenovirus es un adenovirus humano. Como se usa en la presente, "adenovirus", "serotipo" o "serotipo adenoviral" se refiere a cualquier adenovirus que pueda asignarse a cualquiera de los más de 50 serotipos adenovirales conocidos en la actualidad, que se clasifican en subgrupos A-F, y se extiende además a cualquier serotipo adenoviral no identificado o no clasificado hasta el momento. Ver, por ejemplo, Strauss, "Adenovirus infections in humans", en The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, Nueva York, NY, páginas 451-596 (1984) y Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication", en Fields Virology, Vol. 2, cuarta edición, Knipe, 35ea., Lippincott Williams & Wilkins, páginas 2265-2267 (2001), como se muestra en la Tabla 1.

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, 36-39, 42-49, 50
E	4
F	40, 41

En una forma de realización, los adenovirus de la presente divulgación son virus del subgrupo B, a saber, Ad11, particularmente Ad11p (la cepa de Slobitski) y derivados de este, tales como EnAd.

Los adenovirus se asignan a sus grupos/serotipos en función de la cápside, tal como el hexón y/o la fibra.

En una forma de realización, el adenovirus de la presente divulgación no es un virus del grupo A, C, D, E o F. Los virus de la presente divulgación no comprenden una proteína de muerte de adenovirus.

En una forma de realización, el adenovirus de la presente divulgación es quimérico. Cuando un adenovirus es quimérico, se emplearán entonces las características de la cápside externa para determinar el serotipo. Como se usa en la presente, quimérico se refiere a un virus que comprende ADN de al menos dos serotipos de virus diferentes, que incluyen diferentes serotipos dentro del mismo grupo.

En una forma de realización, el virus oncolítico tiene proteínas de hexón, pentón y fibra del mismo serotipo, por ejemplo, Ad11, en particular, Ad11p, por ejemplo, encontradas en las posiciones 30812-31789, 18254-21100 y 13682-15367 de la secuencia genómica de este último, en donde las posiciones del nucleótido se refieren a Genbank ID 217307399 (N.º de acceso: GC689208).

En una forma de realización, el adenovirus es enadenotucirev (también conocido como EnAd y anteriormente como EnAd). Como se usa en la presente, enadenotucirev se refiere al adenovirus quimérico de SEQ ID NO: 28. Es un adenovirus quimérico oncolítico competente para la replicación que tiene propiedades terapéuticas mejoradas en comparación con adenovirus de tipo silvestre (ver WO2005/118825). EnAd tiene una región E2B quimérica, que presenta ADN de Ad11p y Ad3, y eliminaciones en E3/E4. Los cambios estructurales en enadenotucirev dan lugar a un genoma que es aproximadamente 3,5 kb más pequeño que Ad11p, lo que proporciona "espacio" adicional para la inserción de transgenes. Casi toda la región E3 y parte de la región E4 está eliminada en EnAd. Por lo tanto, tiene espacio significativo en el genoma para admitir material genético adicional sin dejar de ser viable. Asimismo, como EnAd es un adenovirus del subgrupo B, una inmunidad preexistente

en seres 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 (ver WO2008/080003 que se incorpora por referencia). Por ende, en una forma de realización, el adenovirus utilizado es OvAd1 o OvAd2.

Al parecer, EnAd infecta preferentemente células tumorales, se replica rápidamente en estas células y genera lisis celular. Esto, a su vez, puede generar respuestas inmunitarias inflamatorias, lo que estimula el cuerpo a luchar también contra el cáncer. Se plantea la hipótesis de que parte del éxito de EnAd está relacionada con la replicación rápida del virus *in vivo*.

Ventajosamente, armar un virus, en donde el ADN codifica ciertas proteínas, tal como un activador biespecífico de linfocitos T, que puede expresarse dentro de la célula cancerosa, puede permitir que se empleen las propias defensas del cuerpo para combatir las células tumorales de manera más eficaz, por ejemplo, al hacer que las células sean más visibles para el sistema inmunitario o al administrar un gen/proteína terapéutica que se dirija preferencialmente a las células tumorales.

Es importante que la expresión de los transgenes no afecte adversamente la replicación u otras propiedades ventajosas del virus. Por lo tanto, el gen o genes deben insertarse en una ubicación que no comprometa la competencia de replicación y otras propiedades ventajosas del virus. Además, el genoma de los adenovirus es muy compacto y, por lo tanto, puede ser difícil encontrar una ubicación adecuada para insertar transgenes. Esto también limita el tamaño de los transgenes que se pueden alojar.

Como se usa en la presente, adenovirus oncolítico significa un adenovirus que inactiva preferentemente las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. En una forma de realización, el virus oncolítico es apoptótico. Es decir, acelera la muerte celular programada.

En una forma de realización, el virus oncolítico es citolítico. La actividad citolítica de los adenovirus oncolíticos de la divulgación puede determinarse en líneas celulares tumorales representativas, y los datos pueden convertirse en una medición de potencia, por ejemplo, al usar un adenovirus que pertenece al subgrupo C, tal como Ad5, como un estándar (es decir, dada una potencia de 1). Un método adecuado para determinar la actividad citolítica es un ensayo MTS (ver el Ejemplo 4, Figura 2 de WO2005/118825 que se incorpora a la presente por referencia).

En una forma de realización, el virus oncolítico es necrolítico. Es decir, causa o acelera la necrosis celular o la muerte celular inmunogénica. En una forma de

realización, la muerte celular necrolítica es ventajosa porque desencadena, induce respuestas inmunitarias de los pacientes (huéspedes).

Como se usa en la presente, adenovirus se refiere, a menos que el contexto indique lo contrario, a un virus capaz de replicación (tal como un virus competente para la replicación) y también a vectores virales deficientes para la replicación.

Como se usa en la presente, capaz de replicación se refiere a un virus competente para la replicación o un virus cuya replicación depende de un factor en las células cancerosas, por ejemplo, un factor regulado de manera ascendente, tal como p53 o similar.

En una forma de realización, el virus es competente para la replicación. En el contexto de la presente memoria descriptiva, competente para la replicación se refiere a un virus que posee toda la maquinaria necesaria para replicarse en células *in vitro* e *in vivo*, es decir, sin la ayuda de una línea celular de empaquetamiento. Un vector viral, por ejemplo, eliminado en la región E1, capaz de replicarse en una línea celular de empaquetamiento complementaria no es un virus competente para la replicación en el presente contexto.

Los vectores virales son deficientes para la replicación y requieren una célula empaquetadora para proporcionar un gen complementario que permita la replicación.

Como se usa en la presente, genoma de adenovirus significa la secuencia de ADN que codifica los elementos y proteínas estructurales que son relevantes para la función/ciclo de vida de un adenovirus.

Todos los genomas de adenovirus humanos examinados hasta la fecha tienen la misma organización general, es decir, los genes que codifican funciones específicas están ubicados en la misma posición en el genoma viral (denominado en la presente como elementos estructurales). Cada extremo del genoma viral tiene una secuencia corta conocida como la repetición terminal invertida (o ITR), que se requiere para la replicación viral. El genoma viral contiene cinco unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), tres unidades tempranas retardadas (IX, IVa2 y E2 tardías) y una unidad tardía (tardía principal) que se procesa para generar cinco familias de mRNA tardíos (L1-L5). Las proteínas codificadas por los genes tempranos participan principalmente en la replicación y modulación de la respuesta de la célula huésped a la infección, mientras que los genes tardíos codifican proteínas estructurales virales. Los genes tempranos tienen la letra E de prefijo y los genes tardíos tienen la letra L de prefijo.

El genoma de los adenovirus es muy compacto, es decir, hay poca secuencia

no codificante, y, por lo tanto, puede ser difícil encontrar una ubicación adecuada para insertar transgenes.

En una forma de realización, el virus oncolítico u oncolítico parcial de acuerdo con la divulgación puede ser el resultado de la eliminación en la región E4 y/o E3, por ejemplo, eliminado en parte de la región E4 o eliminado por completo en la región E3, o alternativamente eliminado en parte de la región E4 (tal como E4orf4) y eliminado por completo en la región E3, por ejemplo, como lo ejemplifican las secuencias divulgadas en la presente.

En una forma de realización, el virus oncolítico es EnAd o un derivado activo de este, el cual retiene las propiedades beneficiosas esenciales del virus. EnAd se divulga en WO2005/118825 (incorporado en la presente por referencia) y la secuencia completa para el virus se proporciona en la presente como SEQ ID NO: 28. La región E2B quimérica se divulga en la presente como SEQ ID NO: 60.

Ventajosamente, los adenovirus de la presente divulgación exhiben perfiles de actividad de virus similar, por ejemplo, replicación y/o infectividad, ante EnAd tras la infección de una variedad de diferentes líneas celulares de cáncer de color *in vitro*.

ELEMENTOS ESTRUCTURALES DE ADENOVIRUS

Dado que la estructura de los adenovirus es generalmente similar, los siguientes elementos se analizan en términos de los elementos estructurales y la nomenclatura usada normalmente que se refiere a estos, que son conocidos por la persona del oficio de nivel medio. Cuando se hace referencia a un elemento en la presente, se hace referencia 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. Esto último es relevante por la redundancia del código de ADN. "Puede que sea necesario tener en cuenta la preferencia de los virus por el uso de codones para obtener mejores resultados.

Cualquier elemento estructural de un adenovirus utilizado en los virus de la presente divulgación puede comprender o consistir en la secuencia natural o puede tener una similitud a lo largo de la longitud dada de al menos 95 %, tal como 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. La secuencia original se puede modificar para omitir 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % del material genético. La persona del oficio de nivel medio es consciente de que, al realizar cambios, los marcos de lectura del virus no deben alterarse de tal manera que se altere la expresión de proteínas estructurales.

En una forma de realización, el elemento determinado es una secuencia de

longitud completa, es decir, el gen de longitud completa.

En una forma de realización, el elemento determinado es menor que una secuencia de longitud completa y retiene la misma función que la secuencia de longitud completa o la función correspondiente a esta.

En una forma de realización, para un elemento determinado que es opcional en los constructos de la presente divulgación, la secuencia de ADN puede ser menor que una longitud completa y no tener funcionalidad.

Los genes estructurales que codifican proteínas estructurales o funcionales del adenovirus están ligados por lo general mediante regiones no codificantes de ADN. Por lo tanto, existe cierta flexibilidad en cuanto a dónde "cortar" la secuencia genómica del elemento estructural de interés (especialmente regiones no codificantes de este) con el fin de insertar un transgén en los virus de la presente divulgación. Por lo tanto, a los fines de la presente memoria descriptiva, el elemento se considerará como un elemento estructural de referencia en la medida en que sea adecuado y no codifique material externo. Por lo tanto, si correspondiera, el gen se asociará a regiones no codificantes adecuadas, por ejemplo, como se encuentra en la estructura natural del virus.

Por lo tanto, en una forma de realización, se inserta un inserto, tal como un ADN que codifica un sitio de restricción y/o un transgén, en una región no codificante del ADN del virus genómico, tal como un intrón o una secuencia intergénica. Dicho esto, algunas regiones no codificantes del adenovirus pueden tener una función, por ejemplo, en el empalme alternativo, la regulación de la transcripción o la regulación de la traducción, y puede que sea necesario tener esto en cuenta.

Los sitios identificados en la presente, que están asociados con la región L5 (por ejemplo, entre L5 y la región E4), son adecuados para alojar una variedad de secuencias de ADN que codifican entidades complejas tales como ARNi, citocinas, proteínas monocatenarias o multiméricas, tales como anticuerpos, tales como un activador biespecífico de linfocitos T.

Gen, como se usa en la presente, se refiere a secuencias codificantes y opcionalmente cualquier secuencia no codificante asociada a estas, por ejemplo, intrones y exones asociados. En una forma de realización, un gen solamente comprende o consiste en componentes estructurales esenciales, por ejemplo, una región codificante.

A continuación se detalla un análisis relacionado con elementos estructurales específicos de adenovirus.

Las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) son comunes para todos los adenovirus conocidos y se denominaron de ese modo debido a su simetría, y son los orígenes cromosómicos virales de la replicación. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad de formar una horquilla.

5'ITR, como se usa en la presente, se refiere a una parte o la totalidad de una ITR del extremo 5' de un adenovirus, que retiene la función de la ITR cuando se incorpora a un adenovirus en una ubicación adecuada. En una forma de realización, la 5'ITR comprende o consiste en la secuencia de alrededor de 1bp a 138bp de SEQ ID NO: 28 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 en de alrededor de 1bp a 138bp de SEQ ID NO: 28.

3'ITR, como se usa en la presente, se refiere a una parte o la totalidad de una ITR del extremo 3' de un adenovirus que retiene la función de la ITR cuando se incorpora a un adenovirus en una ubicación adecuada. En una forma de realización, la 3'ITR comprende o consiste en la secuencia de alrededor de 32189bp a 32326bp de SEQ ID NO: 28 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 en de alrededor de 32189bp a 32326bp de SEQ ID NO: 28.

B1, como se usa en la presente, se refiere a la secuencia de ADN que codifica: una parte o la totalidad de la E1A de un adenovirus, una parte o la totalidad de la región E1B de un adenovirus e, independientemente, una parte o la totalidad de las regiones E1A y E1B de un adenovirus.

Cuando B1 es un enlace, las secuencias E1A y E1B se omitirán del virus. En una forma de realización, B1 es un enlace y, por ende, el virus es un vector.

En una forma de realización, B1 comprende además un transgén. Se conoce en la técnica que la región E1 puede alojar un transgén que se puede insertar de manera disruptiva en la región E1 (es decir, en el "medio" de la secuencia) o una parte o la totalidad de la región E1 se puede eliminar para proporcionar más espacio para alojar el material genético.

Como se usa en la presente, E1A se refiere a la secuencia de ADN que codifica una parte o la totalidad de la región E1A de un adenovirus. Esta última se refiere aquí al polipéptido/proteína E1A. Se puede mutar de modo tal que la proteína codificada por el gen E1A tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de modo tal que tenga: la misma función que la de tipo silvestre (es decir, la proteína no mutada correspondiente); una función aumentada en comparación

con la proteína de tipo silvestre; una función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre; o que tenga una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre, o una combinación de estas según sea adecuado.

Como se usa en la presente, E1B se refiere a la secuencia de ADN que codifica una parte o la totalidad de una región E1B del adenovirus (es decir, polipéptido o proteína), la cual se puede mutar de modo tal que la proteína codificada por la región/gen E1B tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de modo tal que tenga: la misma función que la de tipo silvestre (es decir, la proteína no mutada correspondiente); una función aumentada en comparación con la proteína de tipo silvestre; una función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre; o que tenga una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre, o una combinación de estas según sea adecuado.

Por lo tanto, B1 puede estar modificado o no modificado con respecto a una región E1 de tipo silvestre, tal como una E1A y/o E1B de tipo silvestre. La persona del oficio de nivel medio puede identificar fácilmente si E1A y/o E1B están presentes o mutadas o eliminadas (en parte).

De tipo silvestre, como se usa en la presente, se refiere a un adenovirus conocido. Un adenovirus conocido es uno que se ha identificado y que ha recibido una denominación, sin importar si la secuencia está disponible.

En una forma de realización, B1 tiene la secuencia de 139bp a 3932bp de SEQ ID NO: 28.

Como se usa en la presente, BA se refiere a la secuencia de ADN que codifica las regiones E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 que incluyen cualesquier secuencias no codificantes, según sea adecuado. En líneas generales, esta secuencia no comprende un transgén. En una forma de realización, la secuencia es sustancialmente similar o idéntica a una secuencia contigua 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, Ad51 o una combinación de estos, tal como Ad3, Ad11 o una combinación de estos. En una forma de realización, E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 se refiere a comprender estos elementos y otros elementos estructurales asociados con la región, por ejemplo, BA incluirá generalmente la secuencia que codifica la proteína IV2a, por ejemplo como sigue: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

En una forma de realización, la región E2B es quimérica. Es decir, comprende

secuencias de ADN de dos o más serotipos adenovirales diferentes, por ejemplo, de Ad3 y Ad11, tal como Ad11p. En una forma de realización, la región E2B tiene la secuencia de 5068bp a 10355bp de SEQ ID NO: 28 o una secuencia 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a esta en la longitud completa.

En una forma de realización, E2B en el componente BA comprende las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 60 (que se corresponde con SEQ ID NO: 3 divulgada en WO2005/118825).

En una forma de realización, BA tiene la secuencia de 3933bp a 27184bp de SEQ ID NO: 28.

Como se usa en la presente, E3 se refiere a la secuencia de ADN que codifica una parte o la totalidad de una región E3 del adenovirus (es decir, proteína/polipéptido), la cual se puede mutar de modo tal que la proteína codificada por el gen E3 tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, de modo tal que tenga la misma función que la de tipo silvestre (la proteína no mutada correspondiente); una función aumentada en comparación con la proteína de tipo silvestre; una función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre o que tenga una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre, o una combinación de estas, según sea adecuado.

En una forma de realización, la región E3 es de un serotipo de adenovirus que se proporciona en la Tabla 1 o una combinación de estos, 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 estos, tales como Ad3, Ad11 (en particular Ad11p) o una combinación de estos.

En una forma de realización, la región E3 se elimina parcialmente, por ejemplo, se elimina en un 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %.

En una forma de realización, B2 es un enlace, en donde el ADN que codifica la región E3 está ausente.

En una forma de realización, un transgén puede reemplazar o interrumpir el ADN que codifica la región E3. Como se usa en la presente, "región E3 reemplazada por un transgén incluye los casos en los que parte o la totalidad de la región E3 está reemplazada con un transgén.

En una forma de realización, la región B2 comprende la secuencia de 27185bp a 28165bp de SEQ ID NO: 28.

En una forma de realización, B2 consiste en la secuencia de 27185bp a

28165bp de SEQ ID NO: 28.

Como se usa en la presente, BX se refiere a la secuencia de ADN en las cercanías del extremo 5' del gen L5 en BB. En las cercanías o de forma próxima al extremo 5' del gen L5, como se usa en la presente, se refiere a: de forma adyacente (contigua) al extremo 5' del gen L5 o una región no codificante asociada inherentemente con aquel, es decir, que es contiguo a, o limita con, el extremo principal 5' del gen L5 o una región no codificante asociada inherentemente con aquel. Alternativamente, en las cercanías de o próximo a puede referirse a estar cerca del gen L5, de modo que no haya secuencias codificantes entre la región BX y el extremo 5' del gen L5.

Por ende, en una forma de realización, BX se une directamente a una base de L5 que representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia codificante del gen L5.

Por ende, en una forma de realización, BX se une directamente a una base de L5 que representa, por ejemplo, el inicio de una secuencia codificante, o se une directamente a una región no codificante asociada naturalmente con L5. Como se usa en la presente, una región no codificante asociada naturalmente a L5 se refiere a una parte o la totalidad de regiones no codificantes que son parte del gen L5 o que están contiguas a este, pero que no son parte de otro gen.

En una forma de realización, BX comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29. Esta secuencia es una secuencia no codificante artificial en donde se puede insertar una secuencia de ADN, por ejemplo, que comprende un transgén (o casete de transgén), un sitio de restricción o una combinación de estos. Esta secuencia es ventajosa porque actúa como un amortiguador en el sentido de que permite cierta flexibilidad en lo que respecta a la ubicación exacta del transgén, al tiempo que minimiza los efectos disruptivos sobre la estabilidad y viabilidad del virus.

Los insertos pueden producirse en cualquier lugar dentro de SEQ ID NO: 29 desde el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto entre bp 1 a 201. En una forma de realización, BX comprende SEQ ID NO: 29 con una secuencia de ADN insertada entre bp 27 y bp 28 o un lugar correspondiente a entre las posiciones 28192bp y 28193bp de SEQ ID NO: 28.

En una forma de realización, el inserto es un inserto del sitio de restricción. En una forma de realización, el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción. En una forma de realización, el sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 19bp que comprende 2 sitios de restricción. En una forma de realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 9bp

que comprende 1 sitio de restricción. En una forma de realización, el inserto del sitio de restricción comprende uno o dos sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una forma de realización, el sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 19bp que comprende 2 sitios de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, uno o dos transgenes. En una forma de realización, el inserto del sitio de restricción es un inserto del sitio de restricción de 9bp que comprende 1 sitio de restricción y al menos un transgén, por ejemplo, dos o tres transgenes, tales como uno o dos. En una forma de realización, dos sitios de restricción tienen entre ambos uno o más transgenes, tales como dos (por ejemplo, en un casete de transgén). En una forma de realización, cuando BX comprende dos sitios de restricción, los mencionados sitios de restricción difieren entre sí. En una forma de realización, dicho uno o más sitios de restricción en BX se producen no naturalmente en el genoma de adenovirus particular en el que se han insertado. En una forma de realización, dicho uno o más sitios de restricción en BX son diferentes a otros sitios de restricción ubicados en otra parte del genoma de adenovirus, por ejemplo, diferentes a sitios de restricción naturales y/o sitios de restricción introducidos en otras partes del genoma, tales como un sitio de restricción introducido en BY. Así, en una forma de realización, el sitio o sitios de restricción permiten que el ADN en la sección se corte específicamente.

Como se usa en la presente, secuencia de ADN en relación con BY se refiere a la secuencia de ADN en las cercanías del extremo 3' del gen L5 de BB. En las cercanías o de forma próxima al extremo 3' del gen L5, como se usa en la presente, se refiere a: de forma adyacente (contigua) al extremo 3' del gen L5 o una región no codificante asociada inherentemente con aquel, es decir, que es contiguo a, o limita con, el extremo principal 3' del gen L5 o una región no codificante asociada inherentemente con aquel (es decir, la totalidad o parte de una secuencia no codificante endógena con respecto a L5). Alternativamente, en las cercanías de o próximo a puede referirse a estar cerca del gen L5, de modo que no haya secuencias codificantes entre la región BY y el extremo 3' del gen L5.

Por ende, en una forma de realización, BY se une directamente a una base de L5 que representa el "final" de una secuencia codificante.

Por ende, en una forma de realización, BY se une directamente a una base de L5 que representa el "final" de una secuencia codificante, o se une directamente a una región no codificante asociada naturalmente con L5.

Inherentemente y naturalmente se usan de manera indistinta en la presente. En

una forma de realización, BY comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30. Esta secuencia es una secuencia no codificante en donde se puede insertar una secuencia de ADN, por ejemplo, que comprende un transgén (o casete de transgén), un sitio de restricción o una combinación de estos. Esta secuencia es ventajosa porque actúa como un amortiguador en el sentido de que permite cierta flexibilidad en lo que respecta a la ubicación exacta del transgén, al tiempo que minimiza los efectos disruptivos sobre la estabilidad y viabilidad del virus.

Los insertos pueden producirse en cualquier lugar dentro de SEQ ID NO: 30 desde el extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto entre bp 1 a 35, por ejemplo, entre los pares de bases 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, 32/33, 33/34, o 34/35.

Como se usa en la presente, E4 se refiere a la secuencia de ADN que codifica una parte o la totalidad de una región E4 del adenovirus (es decir, región de polipéptido/proteína), la cual se puede mutar de modo tal que la proteína codificada por el gen E4 tenga cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, y tiene la misma función que la de tipo silvestre (la proteína no mutada correspondiente); una función aumentada en comparación con la proteína de tipo silvestre; una función disminuida, tal como ninguna función en comparación con la proteína de tipo silvestre o que tenga una nueva función en comparación con la proteína de tipo silvestre, o una combinación de estas, según sea adecuado. En una forma de realización, en la región E4, E4orf4 está eliminada.

En una forma de realización, la región E4 está eliminada parcialmente, por ejemplo, eliminada en un 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %. En una forma de realización, la región E4 tiene la secuencia de 32188bp a 29380bp de SEQ ID NO: 28.

En una forma de realización, B3 es un enlace, es decir, en donde E4 está ausente.

En una forma de realización, B3 tiene la secuencia que consiste en de 32188bp a 29380bp de SEQ ID NO: 28.

Como se usan en la presente, los rangos de números incluyen los extremos.

La persona del oficio de nivel medio apreciará que los elementos en la fórmulas en la presente, tales como la Fórmula (I) son contiguos y pueden representar secuencias de ADN no codificantes así como los genes y secuencias de ADN codificantes (características estructurales) mencionados en la presente. En una o más

formas de realización, las fórmulas de la presente divulgación intentan describir una secuencia natural en el genoma de adenovirus. En este contexto, será claro para la persona del oficio de nivel medio que la fórmula se refiere a los elementos principales que caracterizan la sección relevante de genoma y no pretende ser una descripción exhaustiva del tramo genómico de ADN.

Como se usan en la presente, cada uno de E1A, E1B, E3 y E4 se refiere independientemente a las formas de tipo silvestre y sus equivalentes, mutadas o parcialmente eliminadas de cada región como se describe en la presente, en particular una secuencia de tipo silvestre de un adenovirus conocido.

Como se usa en la presente, inserto se refiere a una secuencia de ADN que se incorpora en el extremo 5', el extremo 3' o dentro de un segmento de referencia de secuencia de ADN dado, de manera que interrumpe la secuencia de referencia. Esta última es una secuencia de referencia utilizada como un punto de referencia en relación con el cual se ubica el inserto. En el contexto de la presente divulgación, los insertos se producen generalmente dentro de SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 30. Un inserto puede ser un inserto del sitio de restricción, un casete de transgén o ambos. Cuando la secuencia se interrumpe, el virus seguirá comprendiendo la secuencia original, pero por lo general será en forma de dos fragmentos que tienen el inserto ubicado entre ambos.

En una forma de realización, el transgén o casete de transgén no comprende un transposón de inserción no sesgado, tal como un transposón TN7 o parte de este. Como se usa en la presente, transposón TN7 se refiere a un transposón de inserción no sesgado como se describe en WO2006/060314.

En una forma de realización, uno o más sitios de restricción en BX y BY se seleccionan independientemente de un sitio de restricción específico para una enzima descrita en la presente, por ejemplo, *NotI*, *FseI*, *AsiSI*, *SgfI* y *SbfI*, en particular, los sitios de restricción insertados son todos diferentes, tales como sitios específicos para *NotI* y sitios específicos para *FseI* ubicados en BX y *SgfI* y *SbfI* ubicados en BY.

Como se analizó anteriormente en una forma de realización, las regiones BX y/o BY no comprenden un sitio de restricción. Ventajosamente, los virus y constructos de la presente divulgación pueden prepararse sin sitios de restricción, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis. Estas técnicas permiten una gran flexibilidad en la creación de los virus y constructos. Además, los presentes inventores han establecido que las propiedades de los virus y constructos no disminuyen cuando se preparan mediante técnicas de síntesis.

Otras secuencias reguladoras

Como se usa en la presente, "regulador de expresión génica" (o elemento regulador/regulatorio) se refiere a una característica genética, tal como un promotor, potenciador o una secuencia aceptora de empalme que cumple una función en la expresión génica, por lo general al iniciar o potenciar la transcripción o traducción.

Como se usa en la presente, "secuencia aceptora de empalme", "aceptor de empalme" o "sitio de empalme" se refiere a una secuencia reguladora que determina cuándo una molécula de mRNA será reconocida por pequeñas ribonucleoproteínas nucleares del complejo espliceosomal. Una vez ensamblado, el espliceosoma cataliza el empalme entre el sitio aceptor de empalme de la molécula de mRNA a un sitio donante de empalme corriente arriba, lo cual produce una molécula de mRNA madura que puede traducirse para producir un solo polipéptido o proteína.

En la presente se pueden usar secuencias aceptoras de empalme de diferentes tamaños, y estas pueden describirse como aceptor de empalme corto (pequeño), aceptor de empalme (mediano) y aceptor de empalme ramificado (grande).

Como se usa en la presente, SSA significa un aceptor de empalme corto, que comprende por lo general solo el sitio de empalme, por ejemplo, 4 pares de bases. Como se usa en la presente, SA significa un aceptor de empalme, que comprende por lo general el aceptor de empalme corto y el tracto de polipirimidina, por ejemplo, 16 pb. Como se usa en la presente, bSA significa un aceptor de empalme ramificado, que comprende por lo general el aceptor de empalme corto, el tracto de polipirimidina y el punto de ramificación, por ejemplo, 26 pares de bases.

En una forma de realización, los aceptores de empalme SA y bSA usados en los constructos de la divulgación se muestran en SEQ ID NO: 45 y 46 respectivamente. En una forma de realización, el SSA se usa en un casete de acuerdo con la presente divulgación y tiene la secuencia de nucleótidos CAGG.

En una forma de realización, el SA se usa en el casete. En una forma de realización, el bSA se usa en el casete.

En una forma de realización, al sitio de empalme le sigue (es decir, le sigue en una dirección de 5' a 3') una secuencia de Kozak de consenso. En una forma de realización, el sitio de empalme y la secuencia de Kozak están separadas por hasta 100 pares de bases o menos. En una forma de realización, la secuencia de Kozak tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 47.

Por lo general, cuando está bajo el control de un promotor endógeno o exógeno (tal como un promotor endógeno), la secuencia codificante estará

inmediatamente precedida por una secuencia de Kozak. El codón de iniciación (AUG) indica el inicio de la región codificante, por ejemplo, está en el contexto de la secuencia (gcc)gccRcc**AUG**g [SEQ ID NO: 48]. Las bases en negrita indican el inicio del "inicio" de las secuencias codificantes. Una letra en minúscula indica bases comunes en esta posición (que pueden sin embargo cambiar) y las letras en mayúscula indican bases altamente conservadas, es decir, la secuencia "AUGG" es constante o no cambia casi nunca, si es que lo hace en absoluto; "R" indica que se observa generalmente una purina (adenina o guanina) en esta posición y la secuencia entre paréntesis (gcc) es de significado incierto. Por ende, en una forma de realización, el codón de iniciación AUG está incorporado en una secuencia de Kozak.

Como se usa en la presente, secuencia de ADN interna de entrada al ribosoma se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES). Como se usa en la presente, IRES significa una secuencia de nucleótidos que permite el inicio de la traducción de una secuencia de ARN mensajero (mARN), que incluye el inicio a partir de una secuencia de mARN. Esto es particularmente útil cuando el casete codifica mARN policistrónico. El uso de una IRES da como resultado un mARN policistrónico que se traduce en múltiples proteínas o péptidos individuales. En una forma de realización, la secuencia de ADN interna de entrada al ribosoma tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 49. En una forma de realización, una IRES particular se usa una sola vez en el genoma. Esto puede tener beneficios con respecto a la estabilidad del genoma.

Como se usa en la presente, "péptido 2A de alta eficiencia de autoescisión" o "péptido 2A" se refiere a un péptido que se escinde de manera eficiente tras la traducción. Los péptidos 2A adecuados incluyen P2A, F2A, E2A y T2A. Los presentes inventores notaron que, una vez usada una secuencia de ADN específica que codifica un péptido 2A determinado, la misma secuencia de ADN específica no puede usarse por segunda vez. Sin embargo, se puede usar la redundancia en el código de ADN para generar una secuencia de ADN que se traduce en el mismo péptido 2A. El uso de péptidos 2A es particularmente útil cuando el casete codifica mARN policistrónico. El uso de péptidos 2A da como resultado la traducción de una sola cadena de polipéptidos, la cual se modifica tras la traducción para generar múltiples proteínas o péptidos individuales.

En una forma de realización, el péptido P2A codificado utilizado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 50. En una forma de realización, el péptido F2A codificado utilizado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51. En una

forma de realización, el péptido E2A codificado utilizado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 52. En una forma de realización, el péptido T2A codificado utilizado tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

En una forma de realización, un mARN o cada mARN codificado por transgenes comprende una secuencia de señal de poliadenilación, tal como, por lo general, al final de una secuencia de mARN, por ejemplo, como se muestra en SEQ ID NO: 54. Por ende, en una forma de realización, el transgén o el casete de transgén comprende al menos una secuencia que codifica una secuencia de señal de poliadenilación.

Como se usa en la presente, "poliA", "señal de poliadenilación" o "secuencia de poliadenilación" significa una secuencia de ADN, que contiene por lo general un sitio AATAAA, que una vez transcrito puede ser reconocido por un complejo de multiproteínas que escinde y poliadenila la molécula de mARN emergente.

En una forma de realización, la secuencia de poliadenilación tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 54.

En una forma de realización, el constructo no incluye una secuencia de poliadenilación. En una forma de realización, el regulador de la expresión génica es una secuencia aceptora de empalme.

Ventajosamente, los adenovirus de la presente divulgación expresan y liberan formas de anticuerpos (tales como un activador biespecífico de linfocitos T) y otras proteínas, tales como citocinas, codificadas por un transgén en estos en el sobrenadante de cultivo *in vitro* o en el estroma de tejido tumoral *in vivo*. Las secuencias líder pueden ayudar a las proteínas/polipéptido o péptido codificado que salen de la célula cancerosa. Por lo tanto, en una forma de realización, la "proteína" codificada comprende una secuencia líder. Como se usa en la presente, secuencia líder se refiere a una secuencia de polinucleótidos ubicada entre la secuencia promotora y la región codificante que puede regular la expresión génica en el nivel de transcripción o traducción.

En una forma de realización, el adenovirus de acuerdo con la presente divulgación comprende un transgén que es un gen indicador que codifica, por ejemplo, un agente para diagnóstico por imágenes que incluye agentes para diagnóstico por imágenes bioluminiscentes y fluorescentes (que incluyen agentes de para diagnóstico por imágenes fluorescentes activables), tales como luciferasa, GFP o eGFP o proteína fluorescente roja.

Como se usa en la presente, gen indicador o secuencia indicadora significa un

gen o secuencia de ADN que produce un producto que se detecta fácilmente en las células eucariotas y que se puede usar como marcador para determinar la actividad de otro gen con el que su ADN se ha ligado o combinado estrechamente. Los genes indicadores confieren características a las células u organismos que los expresan que se identifican y miden fácilmente, o son marcadores seleccionables. Los genes indicadores a menudo se usan como indicio de si un determinado gen ha sido absorbido o expresado en la población de células o organismos. Los ejemplos de genes indicadores comunes incluyen, entre otros, LacZ, luciferasa, GFP, eGFP, neomicina fosfotransferasa, cloranfenicol acetiltransferasa, simportador de yoduro de sodio (NIS), metaloproteínas intracelulares nitroreductasa (por ejemplo, NfsA, NfsB), HSV1-tk o receptor de estrógeno.

En una forma de realización, el material genético (en particular el transgén) no codifica o expresa un gen indicador, tal como un agente para diagnóstico por imágenes, luciferasa, GFP o eGFP.

Los virus de acuerdo con la presente divulgación pueden investigarse por su preferencia al respecto de un tipo de tumor específico mediante el examen de su potencial lítico en un panel de células tumorales, por ejemplo, las líneas celulares de tumores de colon incluyen HT-29, DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48, y Colo320DM. Cualesquier líneas celulares de tumores de colon disponibles serían igualmente útiles para tal evaluación.

Las líneas celulares de próstata incluyen células DU145 y PC-3. Las líneas celulares pancreáticas incluyen células Panc-1. Las líneas celulares de tumores de mama incluyen la línea celular MDA231 y las líneas celulares de ovario incluyen la línea celular OVCAR-3. Las líneas celulares hemopoyéticas incluyen, entre otras, las células linfoides B Raji y Daudi, las células eritroblastoides K562, las células mieloides U937 y los linfocitos T linfoides HSB2. Otras líneas celulares de tumores disponibles son igualmente útiles.

La presente divulgación también abarca nuevas secuencias divulgadas en la presente. En una forma de realización, el virus se muestra en cualquiera de las secuencias divulgadas en la presente.

Formulaciones

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

En una forma de realización, se proporciona una formulación parenteral líquida, por ejemplo, para infusión o inyección, de un oncolítico capaz de replicarse de acuerdo

con la presente divulgación, en donde la formulación proporciona una dosis en el rango que va de 1×10^{10} a 1×10^{14} partículas virales por volumen de dosis.

Formulación parenteral significa una formulación diseñada para que no se administre a través del tracto gastrointestinal (GI). Las vías de administración parenteral típicas incluyen inyección, implantación o infusión. En una forma de realización, la formulación se proporciona en una forma para la administración en bolo.

En una forma de realización, la formulación parenteral está en forma de inyección. Inyección incluye inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intramuscular. Como se usa en la presente, inyección significa la inserción de líquido en el cuerpo con una jeringa. En una forma de realización, el método de la presente divulgación no implica una inyección intratumoral.

En una forma de realización, la formulación parenteral está en forma de infusión.

Como se usa en la presente, infusión significa la administración de fluidos a una velocidad más lenta mediante goteo, bomba de infusión, bomba de infusión de jeringa o dispositivo equivalente. En una forma de realización, la infusión se administra durante un período en el rango de 1,5 minutos a 120 minutos, tal como alrededor de 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, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 o 115 minutos.

En una forma de realización, una dosis de la formulación es menor de 100 ml, por ejemplo, 30 ml, tal como administrada por una bomba de infusión de jeringa. En una forma de realización, una dosis de la formulación es menor de 10 ml, por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 ml. En una forma de realización, una dosis de la formulación es menor de 1 ml, tal como 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 o 0,1 ml.

En una forma de realización, la inyección se administra como una inyección lenta, por ejemplo, durante un período de 1,5 a 30 minutos.

En una forma de realización, la formulación es para administración intravenosa (i.v.). Esta vía es particularmente eficaz para la administración del virus oncolítico ya que permite un rápido acceso a la mayor parte de los órganos y tejidos, y es particularmente útil para el tratamiento de metástasis, por ejemplo, metástasis establecidas, especialmente aquellas ubicadas en regiones altamente vascularizadas tales como el hígado y los pulmones.

Por lo general, las formulaciones terapéuticas serán estériles y estables en condiciones de producción y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra formulación parenteral adecuada para la

administración a un ser humano y puede formularse como un dispositivo precargado tal como una jeringa o vial, particularmente como dosis única.

La formulación generalmente comprenderá un diluyente o portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, por ejemplo, un portador isotónico no tóxico que es compatible con el virus, y en el que el virus es estable durante el período de tiempo requerido.

El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un dispersante o tensioactivo tal como lecitina o un tensioactivo no iónico tal como polisorbato 80 o 40. En dispersiones, el mantenimiento del tamaño de partícula requerido puede ser asistido por la presencia de un tensioactivo. Los ejemplos de agentes isotónicos incluyen azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

En una forma de realización, las formulaciones parenterales utilizadas pueden comprender uno o más de los siguientes: un amortiguador, por ejemplo, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico, un amortiguador de fosfato y/o un amortiguador Tris, un azúcar, por ejemplo, dextrosa, manosa, sacarosa o similar, una sal tal como cloruro de sodio, cloruro de magnesio o cloruro de potasio, un detergente tal como un tensioactivo no iónico tal como brij, PS-80, PS-40 o similar. La formulación también puede comprender un conservante tal como EDTA o etanol o una combinación de EDTA y etanol, que se cree que previenen una o más vías de posible degradación.

En una forma de realización, la formulación comprenderá el virus oncolítico purificado de acuerdo con la presente divulgación, por ejemplo, 1×10^{10} a 1×10^{14} partículas virales por dosis, tal como 1×10^{10} a 1×10^{12} partículas virales por dosis. En una forma de realización, la concentración de virus en la formulación está en el rango que va de 2×10^8 a 2×10^{14} vp/ml, tal como 2×10^{12} vp/ml.

En una forma de realización, la formulación parenteral comprende glicerol.

En una forma de realización, la formulación comprende adenovirus oncolítico como se describe en la presente, HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico), glicerol y amortiguador.

En una forma de realización, la formulación parenteral consiste en el virus de la divulgación, HEPES, por ejemplo, 5mM, glicerol, por ejemplo, 5-20 % (v/v), ácido clorhídrico, por ejemplo, para ajustar el pH al rango de 7-8 y agua para inyección.

En una forma de realización, 0,7 ml del virus de la divulgación en una

concentración de 2×10^{12} vp/ml se formulan en 5 mM de HEPES, glicerol al 20 % con un pH final de 7,8.

Un análisis exhaustivo de portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico se encuentra disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

En una forma de realización, la formulación se proporciona como una formulación para administraciones tópicas, que incluye inhalación.

Las preparaciones inhalables adecuadas incluyen polvos inhalables, aerosoles dosificadores que contienen gases propulsores o soluciones inhalables libres de gases propulsores. Los polvos inhalables de acuerdo con la divulgación contendrán por lo general un virus como se describe en la presente con un excipiente aceptable desde el punto de vista fisiológico.

Estos polvos inhalables pueden incluir monosacáridos (por ejemplo, glucosa o arabinosa), disacáridos (por ejemplo, lactosa, sacarosa, maltosa), oligosacáridos y polisacáridos (por ejemplo, dextranos), polialcoholes (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, carbonato de calcio) o mezclas de estos entre sí. Se usan adecuadamente monosacáridos y disacáridos, el uso de lactosa o glucosa, particularmente, pero no exclusivamente, en forma de sus hidratos.

Las partículas para la deposición en el pulmón requieren un tamaño de partícula menor de 10 micrómetros, tal como de 1-9 micrómetros, por ejemplo de 0,1 a 5 μm , en particular de 1 a 5 μm . El tamaño de partícula para el transporte del virus es de suma importancia y, por ende, en una forma de realización, el virus de acuerdo con la presente divulgación puede ser adsorbido o absorbido en una partícula, tal como una partícula de lactosa del tamaño determinado.

Los gases propulsores que pueden usarse para preparar los aerosoles inhalables son conocidos en la técnica. Los gases propulsores adecuados se seleccionan de hidrocarburos, tales como n-propano, n-butano o isobutano, y halohidrocarburos, tales como derivados clorinados y/o fluorinados de metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano. Los gases propulsores mencionados anteriormente puede usarse por sí solos o en mezclas entre sí.

Los gases propulsores particularmente adecuados son derivados de alcanos halogenados seleccionados de TG 11, TG 12, TG 134a y TG227. De los hidrocarburos halogenados mencionados anteriormente, TG134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano), TG227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) y mezclas de estos son particularmente adecuados.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propulsores pueden contener

también otros ingredientes, tales como cosolventes, estabilizantes, tensioactivos, antioxidantes, lubricantes y medios para ajustar el pH. Todos estos ingredientes son conocidos en la técnica.

Los aerosoles inhalables que contienen gases propulsores de acuerdo con la invención pueden contener hasta 5 % en peso de sustancia activa. Los aerosoles de acuerdo con la invención contienen, por ejemplo, de 0,002 a 5 % en peso, 0,01 a 3 % en peso, 0,015 a 2 % en peso, 0,1 a 2 % en peso, 0,5 a 2 % en peso o 0,5 a 1 % en peso de ingrediente activo.

Alternativamente, las administraciones tópicas al pulmón también pueden ser mediante la administración de una solución líquida o formulación en suspensión, por ejemplo, con 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 Pari Master(R) fabricado por Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, Va.).

El virus de la invención se puede administrar dispersado en un solvente, por ejemplo, en forma de una solución o una suspensión, por ejemplo, como ya se ha descrito anteriormente para formulaciones parenterales. Puede suspenderse en una solución fisiológica adecuada, por ejemplo, solución salina u otro solvente aceptable desde el punto de vista farmacológico o una solución amortiguada. Las soluciones amortiguadas conocidas en la técnica pueden contener de 0,05 a 0,15 mg de edetato disódico, de 8,0 mg a 9,0 mg de NaCl, de 0,15 mg a 0,25 mg de polisorbato, de 0,25 mg a 0,30 mg de ácido cítrico anhidro, y de 0,45 mg a 0,55 mg de citrato de sodio por 1 ml de agua para lograr un pH de alrededor de 4,0 a 5,0.

Las suspensiones terapéuticas o formulaciones en solución también pueden contener uno o más excipientes. Los excipientes se conocen en el estado de la técnica e incluyen amortiguadores (por ejemplo, amortiguador de citrato, amortiguador de fosfato, amortiguador de acetato y amortiguador de bicarbonato), aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero), EDTA, cloruro de sodio, liposomas, manitol, sorbitol y glicerol. Las soluciones o suspensiones se pueden encapsular en liposomas o microesferas biodegradables. La formulación generalmente se proporciona en una forma sustancialmente estéril mediante procesos de fabricación estériles.

Esto puede incluir la producción y esterilización mediante filtración de solvente/solución amortiguada utilizada para la formulación, suspensión aséptica del anticuerpo en la solución de solvente amortiguada estéril y la administración de la

formulación en receptáculos estériles mediante métodos conocidos por las personas del oficio de nivel medio.

La formulación nebulizable de acuerdo con la presente divulgación puede proporcionarse, por ejemplo, como unidades de dosis única (por ejemplo, viales o recipientes plásticos sellados) envasadas en sobres metalizados. Cada vial contiene una dosis unitaria en un volumen, por ejemplo, 2 ml, de amortiguador de solvente/solución.

Tratamiento

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

En una forma de realización, el método de tratamiento es para usar en el tratamiento de un tumor, en particular un tumor sólido.

Como se usa en la presente, tumor pretende referirse a una masa anormal de tejido que se genera de la división celular excesiva que no se puede controlar y que es progresiva, también denominada neoplasma. Los tumores pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos. Tumor abarca todas las formas de cáncer y metástasis.

En una forma de realización, el tumor es un tumor sólido. El tumor sólido puede estar localizado o haber hecho metástasis.

En una forma de realización, el tumor es de origen epitelial.

En una forma de realización, el tumor es una neoplasia, tal como cáncer colorrectal, hepatoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de pulmón.

En una forma de realización, el tumor es una neoplasia colorrectal.

Como se usa en la presente, neoplasia significa células cancerosas.

En una forma de realización, el adenovirus oncolítico se utiliza en el tratamiento o prevención de metástasis.

En una forma de realización, el método o formulación en la presente se usa en el tratamiento de tipos de cáncer resistentes a los fármacos.

En una forma de realización, el virus se administra en combinación con la administración de un tratamiento o una terapia contra el cáncer adicional.

En una forma de realización, se proporciona un virus o formulación de acuerdo con la presente divulgación para usar en la producción de un medicamento para el tratamiento contra el cáncer, por ejemplo, un tipo de cáncer descrito anteriormente.

En un aspecto adicional, se proporciona un método de tratamiento contra el cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus o formulación de acuerdo con la presente divulgación a un paciente que lo necesite, por ejemplo, un paciente humano.

En una forma de realización, el virus oncolítico o formulación en la presente se administra en conjunto con otro tratamiento.

Como se usa en la presente, en combinación pretende abarcar el lugar donde se administra el virus oncolítico antes del, de manera concurrente con y/o después del tratamiento o terapia contra el cáncer.

El tratamiento contra el cáncer incluye cirugía, radioterapia, tratamiento dirigido y/o quimioterapia. Como se usa en la presente, tratamiento contra el cáncer se refiere al tratamiento con un compuesto terapéutico o agente biológico, por ejemplo, un anticuerpo para tratar el cáncer y/o tratamiento de mantenimiento de este.

En una forma de realización, el tratamiento contra el cáncer se selecciona de cualquier otro tratamiento antineoplásico, que incluye un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico dirigido, radioterapia, tratamiento con radioisótopos o cualquier combinación de estos.

En una forma de realización, el virus de la presente divulgación, tal como un adenovirus oncolítico, se puede usar como un tratamiento previo a la terapia, tal como una cirugía (terapia neoadyuvante), para reducir el tumor, para tratar la metástasis y/o prevenir la metástasis u otras metástasis. El adenovirus oncolítico se puede usar después de la terapia, tal como una cirugía (terapia adyuvante), para tratar la metástasis y/o prevenir la metástasis u otras metástasis.

Como se usa en la presente, concurrentemente es la administración del tratamiento contra el cáncer adicional al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo que la formulación de adenovirus oncolítico. El tratamiento puede estar contenido dentro de la misma formulación o administrarse como una formulación separada.

En una forma de realización, el virus se administra en conjunto con la administración de un agente quimioterapéutico.

Como se usa en la presente, agente quimioterapéutico pretende referirse a fármacos o agentes químicos antineoplásicos específicos que destruyen selectivamente células y tejidos malignos. Por ejemplo, agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de la topoisomerasa y otros agentes antitumorales. Otros ejemplos de quimioterapia incluyen doxorrubicina,

5-fluorouracilo (5-FU), paclitaxel, capecitabina, irinotecán y platinos tales como cisplatino y oxaliplatino. El especialista puede elegir la dosis preferida en función de la naturaleza del tipo de cáncer que se está tratando.

En una forma de realización, el agente terapéutico es ganciclovir, el cual puede ayudar a controlar las respuestas inmunitarias y/o la vascularización tumoral.

En una forma de realización, uno o más tratamientos utilizados en el método en la presente son metronómicos, es decir, son tratamientos continuos o frecuentes con bajas dosis de fármacos antineoplásicos, a menudo administrados de manera concomitante con otros métodos de tratamiento.

Los adenovirus oncolíticos del subgrupo B, en particular Ad11, y aquellos derivados de estos, tales como EnAd, pueden ser particularmente sinérgicos con agentes quimioterapéuticos porque parecen tener un mecanismo de acción que es en gran medida independiente de la apoptosis, e inactivan células cancerosas mediante un mecanismo predominantemente necrolítico. Asimismo, la inmunosupresión que se produce durante la quimioterapia puede permitir que el virus oncolítico funcione con mayor eficiencia.

Como se usa en la presente, dosis terapéutica se refiere a la cantidad de virus, tal como adenovirus oncolítico, que es adecuada para lograr el efecto terapéutico buscado cuando se usa en un régimen de tratamiento adecuado, por ejemplo, mejora los síntomas o condiciones de una enfermedad. Una dosis puede considerarse una dosis terapéutica en el tratamiento contra el cáncer o metástasis cuando la cantidad de partículas virales puede ser suficiente para dar como resultado lo siguiente: el crecimiento tumoral o metastásico se reduce o se detiene, o se encuentra que el tumor o la metástasis se reduce de tamaño, y/o la expectativa de vida del paciente se extiende. Las dosis terapéuticas adecuadas son por lo general un equilibrio entre efecto terapéutico y toxicidad tolerable, por ejemplo, donde el efecto secundario y la toxicidad son tolerables en vista del beneficio logrado por el tratamiento.

En una forma de realización, un virus o constructo terapéutico de acuerdo con la presente divulgación (que incluye una formulación que lo comprende) se administra semanalmente, por ejemplo, en la semana 1 la dosis se administra los días 1, 3, 5, seguido de una dosis cada semana subsiguiente.

En una forma de realización, un virus o constructo terapéutico de acuerdo con la presente divulgación (que incluye una formulación que lo comprende) se administra cada dos o tres semanas, por ejemplo, se administra en la semana 1 en los días 1, 3 y 5, y en la semana 2 o 3 también se administra en los días 1, 3 y 5 de esta. Este

régimen de dosis puede repetirse tantas veces como sea adecuado.

En una forma de realización, un virus o constructo terapéutico de acuerdo con la presente divulgación (que incluye una formulación que lo comprende) se administra mensualmente.

En una forma de realización, los virus y constructos de la presente divulgación se preparan mediante técnicas recombinantes. La persona del oficio de nivel medio apreciará que el genoma del adenovirus armado se puede producir mediante otros medios técnicos, que incluyen sintetizar completamente el genoma o un plásmido que comprende parte o la totalidad del genoma. La persona del oficio de nivel medio apreciará que, en el caso de sintetizar el genoma, la región de inserción puede no comprender los nucleótidos del sitio de restricción ya que estos son artefactos que siguen a la inserción de genes mediante métodos de clonación.

La divulgación en la presente también abarca un adenovirus de la Fórmula (I) o una subfórmula de esta, obtenido o que se puede obtener a partir de la inserción de un transgén o casete de transgén.

Como se usa en la presente, "es" significa que comprende.

En el contexto de esta memoria descriptiva, "que comprende" ha de interpretarse como "que incluye".

Las formas de realización de la invención que comprenden ciertas características/elementos también pretenden abarcar formas de realización alternativas "que consisten" o "que consisten esencialmente" en los elementos/características relevantes.

Cuando sea técnicamente adecuado, se pueden combinar formas de realización de la invención.

Las referencias técnicas, tales como patentes y solicitudes, se incorporan en la presente por referencia.

Cualquier forma de realización citada específica y explícitamente en la presente pueden formar la base de una renuncia a una reivindicación, ya sea sola o en combinación con una o más formas de realización adicionales.

La presente solicitud reivindica la prioridad de GB1713765.4, WO2018/041838 y WO2018/041827, incorporados en la presente por referencia. Estos documentos pueden usarse para corregir errores en la presente memoria descriptiva, en particular algún error en el listado de secuencias.

La presente invención se describe además solo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos, que se refieren a las Figuras adjuntas, en las que:

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figure 1** Muestra esquemas de los casetes de transgén NG-615, NG-640 y NG-641.
- Figura 2:** **Replicación del genoma del virus en líneas celulares de carcinoma de pulmón, mama y vejiga.** Se trataron líneas celulares A549 (A), MDA-MB-453 (B) y RT4 (C) con partículas de virus NG-617, NG-615, NG-640, NG-641 o enadenotucirev por hasta 7 días. La cantidad de genoma del virus detectada mediante qPCR se evaluó en los días 2, 3, 4 y 7 después del tratamiento.
- Figura 3:** **Oncólisis mediada por virus de células de carcinoma de pulmón.** Se trataron células A549 con partículas de virus NG-617, NG-615, NG-640, NG-641 o enadenotucirev por hasta 4 días. Se evaluó la viabilidad celular en todo el cultivo con un sistema xCelligence (A). Se determinó el momento en el que se observó una inactivación de 50 % (KT50) para cada tratamiento con virus (B).
- Figura 4:** **Expresión del transgén NG-615 en células de carcinoma de pulmón y vejiga.** Se trataron células A549 (paneles izquierdos) y RT4 (paneles derechos) con partículas de virus NG-615 o enadenotucirev o se las dejó sin infectar por hasta 7 días. Se evaluó la secreción del ligando Flt3 (A), MIP1 α (B) e IFN α (C) en los sobrenadantes celulares mediante ELISA. No se detectó expresión alguna de transgén en células de control tratadas con enadenotucirev o no tratadas (datos no mostrados).
- Figura 5:** **Expresión del transgén NG-641 en células de carcinoma de pulmón y vejiga.** Se trataron células A549 (paneles izquierdos) y RT4 (paneles derechos) con partículas de virus NG-641 o enadenotucirev o se las dejó sin infectar por hasta 7 días. Se evaluó la secreción del CXCL9 (A), CXCL10 (B) o IFN α (C) en los sobrenadantes celulares mediante ELISA. No se detectó expresión alguna de transgén en células de control tratadas con enadenotucirev o no tratadas (datos no mostrados).
- Figura 6:** **Expresión de transgenes funcionales en células de carcinoma de pulmón.** Se trataron células A549 con partículas de virus NG-615, NG-641 o enadenotucirev por hasta 4 días. En el día 4 después del tratamiento, se evaluó el nivel de transgenes IFN α (A) o MIP1 α (B) funcionales en producción mediante ensayos indicadores a base de células.

- Figura 7: Expresión de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP funcional en células de carcinoma de pulmón.** Se trataron células A549 con partículas de virus NG-615, NG-641 o enadenotucirev por hasta 4 días. En los días 2 (A), 3 (B) y 4 (C) después del tratamiento, se evaluó el nivel de expresión de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP funcional en los sobrenadantes celulares al medir la activación de una línea de linfocitos T Jurkat cocultivada con FAP que expresa la línea celular de fibroblastos MRC-5.
- Figura 8A: IFN α codificado por transgén en sobrenadante de células A549 infectadas con NG-641 induce la producción de SEAP por parte de células indicadoras Jurkat Dual.** Células indicadoras Jurkat-Dual se trataron con sobrenadante de una línea celular de cáncer A549 ya sea no infectada (UIC) o infectada con enadenotucirev (EnAd) o NG-641 y se midió el nivel del indicador de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP).
- Figura 8B: CXCL9/10 codificado por transgén en sobrenadante de células A549 infectadas con NG-641 activa la vía de GPCR en células PathHunter β -arrestina.** Células PathHunter β -arrestina se trataron con sobrenadante de una línea celular de cáncer A549 ya sea no infectada (UIC) o infectada con enadenotucirev (EnAd) o NG-641 y se detectó la inducción específica de CXCL9/10 del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) mediante luminiscencia.
- Figura 9: CXCL9/10 codificado por transgén en sobrenadante de células A549 infectadas con NG-641 induce la regulación descendente de CXCR3 en la superficie de linfocitos T activados.** Linfocitos T humanos activados anti-CD3/CD28 se trataron con sobrenadante de una línea celular de cáncer A549 ya sea no infectada (UIC) o infectada con enadenotucirev (EnAd) o NG-641 y se midió la regulación descendente de CXCR3 inducida por CXCL9/10 de transgén mediante citometría de flujo.
- Figura 10: Activación de linfocitos T infiltrantes de tumor endógenos en cultivos ex vivo de muestras tumorales humanas primarias inoculadas con EnAd, NG-615, NG-617, NG-640 o NG-641, anti-CD3/28 o dejadas sin infectar (UIC)**
Se muestran niveles de los productos de transgén de virus IFN α y Flt3L

en A) y se muestran niveles de $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-17A, granzima B e IL-13 se muestran en B).

Figura 11: **Activación de expresión del marcador de superficie y citocinas intracelulares en linfocitos T infiltrantes de tumor endógenos en cultivos *ex vivo* de una muestra de tumor de NSCLC primaria tratada con EnAd, NG-617, NG-640 o NG-641 o dejada sin infectar (UIC).** Se muestran niveles de linfocitos T CD4 y CD8 que expresan CD25, CD69 y CD107a en A & B, respectivamente. Se muestran niveles de $\text{IFN}\gamma$ y $\text{TNF}\alpha$ intracelulares expresados por linfocitos T CD4 y CD8 en C & D, respectivamente.

Figura 12 Representación esquemática de un anticuerpo activador biespecífico de linfocitos T de la presente divulgación que comprende o carece de una etiqueta de afinidad de decahistidina opcional. Ig SP: péptido de señal; 10His: etiqueta de afinidad de decahistidina; L: ligador de GS; V_L : dominio liviano variable; V_H dominio pesado variable.

Figura 13 **(A)** transferencia en mancha que muestra la cuantificación de los activadores biespecíficos de linfocitos T recombinantes. **(B)** muestra un gráfico que muestra los resultados de ELISA para FAP.

Figura 14 muestra un gráfico que muestra los niveles de expresión de CD69 **(A)** y CD25 **(B)** para linfocitos T cocultivados solos o con células NHDF en presencia de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP y activador biespecífico de linfocitos T de control medidos mediante citometría de flujo. **(C)** gráfico que muestra los niveles de expresión de IFN γ para linfocitos T cocultivados en soledad o con células NHDF en presencia de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP y activador biespecífico de linfocitos T de control medidos mediante tinción de citocinas intracelulares.

Figura 15 **(A)** gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células NHDF que se han cocultivado con linfocitos T y activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. **(B)** gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células BTC100 que se han cocultivado con linfocitos T y activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. **(C)** Imágenes de células NHDF después del cocultivo con

linfocitos T y activador biespecífico de linfocitos T anti FAP en comparación con activador biespecífico de linfocitos T de control.

Figura 16 (A) gráficos de dispersión que muestran la expresión de FAP en múltiples células derivadas de paciente. (B) gráfico que muestra el % de células que expresan EpCAM y FAP a lo largo de múltiples células y líneas celulares.

Figura 17 (A) gráfico que muestra la respuesta a la dosis de NHDF para activador biespecífico de linfocitos T anti FAP con concentración de activador biespecífico de linfocitos T en aumento. Gráficos (B) y (C) que muestran los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células DLD que se han cocultivado con linfocitos T y activador biespecífico de linfocitos T EpCAM o activador biespecífico de linfocitos T de control.

Figura 18 (A) gráfico que muestra la expresión de FAP en células CHO determinada por FAP o anticuerpo de control de isótopos y analizada mediante citometría de flujo. (B) muestra un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células CHO o CHO-FAP que se han cocultivado con linfocitos T y activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control.

Figura 19 muestra un gráfico que muestra la activación de linfocitos T (en función de los niveles de expresión de CD69 y CD25) por las células CHO en comparación con las células CHO-FAP, analizada mediante citometría de flujo.

Figura 20 (A) gráfico que muestra la capacidad de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP de activar linfocitos T CD4+ o CD8+ (en función de los niveles de expresión de CD69 y CD25), analizada mediante citometría de flujo. (B) gráfico que muestra los resultados de un ensayo de LDH que muestra la citotoxicidad de las células NHDF que se han cocultivado con linfocitos T CD4+ o CD8+ y activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control.

Figura 21 (A) gráfico que muestra la cantidad de linfocitos T CD3+ de ascitis cultivados con activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. (B) gráfico que muestra los niveles de expresión de CD25 de linfocitos T de ascitis cultivados con

activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. **(C)** gráfico que muestra la cantidad de células FAP+ de ascitis cultivadas con activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control.

- Figura 22** **(A)** gráfico que muestra la cuantificación de la cantidad de genomas de virus detectados por célula para NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd. **(B)** gráficos que muestran la actividad oncolítica de NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 o EnAd evaluada mediante la infección de las células A549.
- Figura 23** **(A)** gráficos que muestran la activación de linfocitos T (en función de los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-601, NG-602, NG-605 y NG-606 cuando se cocultivan con CHO-FAP, analizada mediante citometría de flujo. **(B)** gráficos que muestran la activación de linfocitos T (en función de los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-601, NG-602, NG-605 y NG-606 cuando se cocultivan con CHO-EpCAM, analizada mediante citometría de flujo.
- Figura 24** muestra gráficos que muestran los resultados de experimentos para determinar la cantidad de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP producido a partir de NG-605 y NG-606.
- Figura 25** muestra imágenes de microscopía de células Ad293 infectadas con NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610.
- Figura 26** **(A)** gráfico que indica la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para inactivar células NHDF, analizada mediante XCELLigence. **(B)** gráfico que indica la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para inactivar células NHDF, analizada mediante un ensayo de LDH.
- Figura 27** muestra gráficos que muestran la activación de linfocitos T (en función de los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 cocultivados con células NHDF, SKOV y linfocitos T, analizada mediante citometría de flujo.
- Figura 28** **(A)** gráfico que muestra la activación de linfocitos T (en función de los niveles de expresión de CD69 y CD25) por NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 cocultivados con células NHDF y SKOV en comparación con SKOV en soledad, analizada mediante citometría de flujo. **(B)** gráfico que indica la citotoxicidad de las células NHDF infectadas con NG-605 y

NG-606, analizada mediante un ensayo de LDH.

- Figura 29** muestra imágenes de fotogramas de videos de lapso de tiempo de lisis de las células NHDF por activador biespecífico de linfocitos T anti FAP recombinante, EnAd, NG-603 o NG-605.
- Figura 30** muestra imágenes de fotogramas de videos de lapso de tiempo de lisis de las células NHDF por NG-607, NG-608, NG-609 o NG-610.
- Figura 31** muestra un gráfico que indica la citotoxicidad de las células DLD infectadas con EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 y NG-604 en presencia de linfocitos T o ausencia de linfocitos T, analizada mediante un ensayo de LDH.
- Figura 32** **(A)** gráfico que indica los niveles de expresión de CD25 en linfocitos T CD3+ en muestras de ascitis que se infectaron con virus de la presente divulgación. **(B)** gráfico que indica la cantidad de células FAP+ en muestras de ascitis que se infectaron con virus de la presente divulgación.
- Figura 33** muestra un gráfico que indica la cantidad de linfocitos T CD3+ en muestras de ascitis obtenidas de un paciente con cáncer e infectadas con virus de la presente divulgación.
- Figura 34** muestra un gráfico que indica los niveles de expresión de CD25 en linfocitos T CD3+ en muestras de ascitis obtenidas de un paciente con cáncer e infectadas con virus de la presente divulgación.
- Figura 35** muestra un gráfico que indica la cantidad de células FAP+ en muestras de ascitis obtenidas de un paciente con cáncer e infectadas con virus de la presente divulgación.
- Figura 36** muestra una comparación de la activación de la producción de citocinas de linfocitos T por la proteína de activador biespecífico de linfocitos T anti FAPrecombinante en presencia de fibroblastos humanos y por la activación policlonal con microesferas anti-CD3/CD28. **(A)** Niveles de IFN γ medidos mediante ELISA. **(B)** Niveles de citocinas medidos por la matriz de microesferas de citocinas.
- Figura 37** **El activador biespecífico de linfocitos T anti FAP induce la desgranulación de linfocitos T y la citotoxicidad específica de las células FAP+**
(A) Desgranulación de linfocitos T en cultivo con células NHDF (5:1) y **(B)** sobrenadantes que contienen activador biespecífico de linfocitos T.

La desgranulación se evaluó mediante la externalización de CD107a después de 6 horas de cultivo con un anticuerpo específico contra CD107a y se midió mediante citometría de flujo. Se utilizaron Dynabeads CD3/CD28 como un control positivo. **(C)** Citotoxicidad de las células NHDF después de 24 horas en cocultivo con linfocitos T (1:5) y diluciones en serie de 10 veces de sobrenadantes que contienen activador biespecífico de linfocitos T. La citotoxicidad se evaluó mediante la liberación de LDH en sobrenadantes de cultivo. **(D)** La lisis de NHDF por la liberación de LDH (izquierda) y la inducción de CD25 en los linfocitos T (derecha) se evaluaron después de 24 horas de cocultivo con linfocitos T derivados de PBMC (1:5) de seis donantes sanos y sobrenadantes que contienen activador biespecífico de linfocitos T.

Figura 38 El EnAd que expresa activador biespecífico de linfocitos T anti FAP inactiva selectivamente los fibroblastos FAP⁺ y disminuye el TGFb en muestras de ascitis peritoneal

(A,B) Cantidad de fibroblastos FAP⁺ **(A)** y células tumorales EpCAM⁺ **(B)** después de 72 horas de cultivo con linfocitos T derivados de PBMC y EnAd o virus recombinantes. Las células de ascitis se aislaron primero de tres pacientes con ascitis y se expandieron *ex vivo*. La cantidad de células se midió a las 72 horas posteriores a la infección mediante citometría de flujo. **(C)** la inducción del marcador de activación CD25 en linfocitos CD3 derivados de PBMC de **(A)** se midió a las 72 horas posteriores a la infección. **(D)** Los niveles de TGFb se midieron mediante ELISA con el uso de sobrenadantes recolectados de **(A)**.

Figura 39 muestra la activación de linfocitos T asociados a tumores endógenos y la muerte asociada de las células FAP⁺ en muestras de biopsia de ascitis maligna en pacientes por la proteína de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP y los virus Enad- activador biespecífico de linfocitos T anti FAP. **(A)** Activación de linfocitos T medida por la expresión de CD25. **(B)** Cantidad residual de células FAP⁺ medidas mediante citometría de flujo.

Figura 40 Efecto de los anticuerpos de bloqueo contra PD-L1 en la activación de linfocitos T mediada por activador biespecífico de linfocitos T en una muestra de paciente

(A) La expresión de PD1 por los linfocitos T endógenos y de PD-L1 en

células FAP+ después de su aislamiento inicial de la ascitis peritoneal se evaluó mediante citometría de flujo. **(B)** Se incubaron células totales no purificadas de ascitis peritoneal en 50 % de fluido del mismo exudado en presencia de activador biespecífico de linfocitos T libre, EnAd o virus recombinante, con o sin anticuerpo de bloqueo anti-PD-L1. Después de 2 días, se recolectó la población celular total, y se cuantificó la cantidad de linfocitos T CD25+ mediante citometría de flujo. **(C)** Cantidad de interferón gamma en sobrenadantes de cultivo de **(B, D)** medida mediante ELISA. **(D)** La cantidad de células FAP+ residuales en **(B)** se midió mediante citometría de flujo.

Figura 41 El EnAd que expresan activador biespecífico de linfocitos T activan y redirigen los linfocitos T de muestras de biopsias de pacientes para lisar los fibroblastos NHDF

(A) La expresión de PD-1 por los linfocitos T endógenos después del aislamiento de donantes sanos o muestras de biopsia de cáncer de exudado maligno. La expresión de PD-1 se midió mediante citometría de flujo. **(B)** La proporción de linfocitos CD3⁺ dentro de la población celular no purificada de PBMC y muestras de biopsia de cáncer según lo medido mediante citometría de flujo. **(C)** Niveles de interferón gamma medidos mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo recolectados de **(B)** a las 120 horas posteriores al tratamiento. **(D)** La viabilidad de los fibroblastos NHDF se monitoreó en tiempo real durante 130 horas mediante el ensayo de citotoxicidad xCELLigence en cocultivo con PBMC o células de biopsia de cáncer totales (1:5) y sobrenadante que contiene activador biespecífico de linfocitos T.

Figura 42 muestra el efecto de las muestras de fluido de ascitis inmunosupresoras en la activación mediada por microesferas de activador biespecífico de linfocitos T anti FAP y anti-CD3/CD28 de linfocitos T de PBMC. (A) Linfocitos T de PBMC activados con Dynabeads anti-CD3/Cd28. (B) Linfocitos T de PBMC activados con activador biespecífico de linfocitos T anti FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control en presencia de células NHDF. NS: suero normal, A: ascitis peritoneal.

Figura 43 El EnAd que expresa activador biespecífico de linfocitos T anti FAP polariza el macrófago CD11b⁺ en pacientes con ascitis a un fenotipo más inflamatorio

(A) Las células totales no purificadas de la muestra de ascitis se incubaron en un fluido de ascitis al 50 % en presencia de virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T o activador biespecífico de linfocitos T libre. Se utilizó el tratamiento con interferón gamma como un control positivo. Después de 3 días, la población celular total se recolectó, y la inducción del marcador de activación CD25 en los linfocitos CD3⁺ se midió mediante citometría de flujo. (B) Los niveles de interferón gamma en sobrenadantes de cultivo de (A) se midieron mediante ELISA. (C) A los 3 días, los niveles de expresión de CD68, CD86, CD206 y CD163 en las células CD11b⁺ de (A) se midieron mediante citometría de flujo. Los espectros representativos de citometría de flujo de triplicados se muestran junto con el conjunto completo de datos.

Figura 44 **Caracterización de la arquitectura y composición celular de un tumor de próstata sólido**

(A) Tinción de EpCAM, (B) tinción de CD8, (C) tinción de FAP. (D) Imágenes de inmunohistoquímica de inducción de CD25 dentro de rebanadas de tumor de próstata luego del tratamiento con activador biespecífico de linfocitos T que expresa virus. Núcleos de tumor se rebanaron en un grosor de 300 μ M con un Leica vibratome, cultivado e infectado en insertos y recolectado luego de 7 días de tratamiento. (E) Niveles de IFN γ en medio de rebanadas de tejido medidos mediante ELISA. Los sobrenadantes se recolectaron a partir de cultivos de rebanadas de tejido maligno y benigno en el punto temporal especificado; (F) Niveles de IL-2 en medio de cultivo tisular de tejido maligno y benigno medidos mediante ELISA.

Figura 45 muestra una representación esquemática del casete de transgén.

Figura 46 muestra un gráfico que indica la cantidad de genomas virales detectados por célula en las células tumorales tratadas con NG-611, NG-612 y NG-617.

Figura 47 muestra el porcentaje de linfocitos T que expresan CD69 (a), CD25 (b) HLA-DR (c), CD40L (d) o la superficie celular CD107a (e) después del cocultivo con células SKOV que expresan EpCam y sobrenadantes recolectados de células A549 a las 24, 48 o 72 horas posteriores al tratamiento con partículas de virus NG-611 en comparación con NG-

612, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar.

- Figura 48** muestra el porcentaje de linfocitos T que expresan CD69 **(a)**, CD25 **(b)** HLA-DR **(c)**, CD40L **(d)** o la superficie celular CD107a **(e)** después del cocultivo con células MRC-5 que expresan FAP y sobrenadantes recolectados de células A549 a las 24, 48 o 72 horas posteriores al tratamiento con partículas de virus NG-612 en comparación con NG-611, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar.
- Figura 49** muestra el porcentaje de células MRC-5 que expresan EpCAM y FAP.
- Figura 50** muestra la expresión de IFN γ en los sobrenadantes de los cocultivos de linfocitos T con células SKOV (A) o células MRC-5 (B) incubadas con los sobrenadantes recolectados de las células A549 a las 24, 48 o 72 horas posteriores al tratamiento con partículas de virus NG-611, NG-612 o enadenotucirev, o sobrenadantes de control sin tratar.
- Figura 51** muestra la eficacia antitumoral y la activación inmunitaria de virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T *in vivo*. **(a)** Volumen tumoral en ratones tratados con solución salina, enadenotucirev o NG-611. **(b)** Relación de los linfocitos T CD8 con respecto a los T CD4 en tumores tratados con NG-611 en comparación con controles tratados con enadenotucirev o sin tratar.
- Figura 52** muestra un gráfico que indica la cantidad de genomas virales detectados por célula en las células tumorales tratadas con NG-612 y NG-615.
- Figura 53** muestra la expresión de IFN α , MIP1 α y Flt3 L en el sobrenadante celular de NG-615 en comparación con el sobrenadante de enadenotucirev y células tumorales de control sin tratar.
- Figura 54** muestra la cantidad de linfocitos T que expresan CD69 **(a)**, CD25 **(b)** HLA-DR **(c)**, CD40L **(d)** o la superficie celular CD107a **(e)** después del cocultivo con células MRC-5 que expresan FAP y sobrenadantes recolectados de células A549 a las 24, 48 o 72 horas posteriores al tratamiento con partículas de virus NG-615 en comparación con NG-612, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar.
- Figura 55** muestra la expresión de IFN γ en los sobrenadantes de los cocultivos de linfocitos T con células MRC-5 incubadas con los sobrenadantes recolectados de las células A549 a las 24, 48 o 72 horas posteriores al tratamiento con partículas de virus NG-612, NG-615 o enadenotucirev, o

sobrenadantes de control sin tratar.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1	Secuencia codificante de ADN de activador biespecífico de linfocitos T anti-FAP, con la secuencia de señal del terminal N y la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 2	Secuencia de aminoácidos de activador biespecífico de linfocitos T anti-FAP, con la secuencia de señal del terminal N y la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 3:	Secuencia codificante de ADN de activador biespecífico de linfocitos T de control (anti-FHA), con la secuencia de señal del terminal N y la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 4:	Secuencia de aminoácidos de activador biespecífico de linfocitos T de control (anti-FHA), con la secuencia de señal del terminal N y la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 5:	Secuencia de aminoácidos anti-CD3 ScFv
SEQ ID NO: 6:	Anti-CD3 VH
SEQ ID NO: 7:	Anti-CD3 VL
SEQ ID NO: 8:	Secuencia ligadora anti-CD3 ScFv
SEQ ID NO: 9:	Anti-FAP ScFv
SEQ ID NO: 10:	Dominio anti-FAP VL
SEQ ID NO: 11:	Dominio anti-FAP VH
SEQ ID NO: 12:	Secuencia ligadora anti-FAP y anti-EpCAM
SEQ ID NO: 13:	Secuencia líder de activador biespecífico de linfocitos T
SEQ ID NO: 14:	activador biespecífico de linfocitos T de control (anti-FHA)
SEQ ID NO: 15:	ScFv de control (anti-FHA)
SEQ ID NO: 16:	VL de control (anti-FHA)
SEQ ID NO: 17:	VH de control (anti-FHA)
SEQ ID NO: 18:	Secuencia ligadora ScFv de control (anti-FHA)
SEQ ID NO: 19:	Secuencia de etiqueta deca-His
SEQ ID NO: 20:	activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP -P2A-RFP (<i>CURSIVA</i> = líder, NEGRITA = sitio de escisión de la furina, <u>SUBRAYADO</u> = secuencia P2A, minúscula =

	RFP)
SEQ ID NO: 21:	activador biespecífico de linfocitos T-P2A-RFP de control (anti-FHA) (<i>CURSIVA</i> = líder, NEGRITA = sitio de escisión de la furina, <u>SUBRAYADO</u> = secuencia P2A, minúscula = RFP)
SEQ ID NO: 22:	Secuencia codificante de ADN de FAP humana
SEQ ID NO: 23:	Secuencia de aminoácidos de FAP humana
SEQ ID NO: 24:	Secuencia promotora de CMV
SEQ ID NO: 25:	Secuencia de poliadenilación tardía de SV40
SEQ ID NO: 26:	NG-605 (EnAd-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP)
SEQ ID NO: 27:	NG-606 (EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP)
SEQ ID NO: 28	Genoma EnAd
SEQ ID NO: 29	Secuencia de ADN DE BX correspondiente a y que incluye bp 28166-28366 del genoma EnAd
SEQ ID NO: 30	Secuencia de ADN DE BY correspondiente a y que incluye bp 29345-29379 del genoma EnAd
SEQ ID NO: 31	Etiqueta HIS
SEQ ID NO: 32	Secuencia aceptora de empalme.
SEQ ID NO: 33	Secuencia de poliadenilación de SV40
SEQ ID NO: 34	Secuencia de ácido nucleico de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (OKT3)
SEQ ID NO: 35	Secuencia de ácido nucleico de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (aCD3)
SEQ ID NO: 36	Casete de transgén NG-611
SEQ ID NO: 37	Casete de transgén NG-612
SEQ ID NO: 38	Casete de transgén NG-613
SEQ ID NO: 39	Inserto del sitio de restricción (BX)
SEQ ID NO: 40	Inserto del sitio de restricción (BY)
SEQ ID NO: 41	Secuencia promotora de CMV
SEQ ID NO: 42	Secuencia promotora de PGK
SEQ ID NO: 43	Secuencia promotora de CBA
SEQ ID NO: 44	Secuencia de ADN ACEPTORA DE EMPALME CORTO (SSA)

SEQ ID NO: 45	Secuencia de ADN ACEPTORA DE EMPALME (SA)
SEQ ID NO: 46	Secuencia de ADN ACEPTORA DE EMPALME RAMIFICADO (BSA)
SEQ ID NO: 47	Secuencia de Kozak (secuencia nula)
SEQ ID NO: 48	Ejemplo de codón de inicio
SEQ ID NO: 49	Secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES)
SEQ ID NO: 50	Péptido P2A
SEQ ID NO: 51	Péptido F2A
SEQ ID NO: 52	Péptido E2A
SEQ ID NO: 53	Péptido T2A
SEQ ID NO: 54	Secuencia de poliadenilación (poliA)
SEQ ID NO: 55	Secuencia líder
SEQ ID NO: 56	Secuencia líder
SEQ ID NO: 57	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE IFN γ
SEQ ID NO: 58	Secuencia de aminoácidos de IFN α
SEQ ID NO: 59	Secuencia de aminoácidos de TNF α
SEQ ID NO: 60	Secuencia de ADN correspondiente a la región E2B del genoma EnAd (bp 10355-5068)
SEQ ID NO: 61:	Secuencia codificante de ADN de activador biespecífico de linfocitos T anti-FAP, con la secuencia de señal del terminal N sin la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 62:	Secuencia de aminoácidos de activador biespecífico de linfocitos T anti-FAP, con la secuencia de señal del terminal N sin la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 63:	Secuencia codificante de ADN de activador biespecífico de linfocitos T de control (Anti-FHA), con la secuencia de señal del terminal N sin la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 64:	Secuencia de aminoácidos de activador biespecífico de linfocitos T de control (Anti-FHA), con la secuencia de señal del terminal N sin la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C.
SEQ ID NO: 65:	activador biespecífico de linfocitos T de control (anti-FHA)

	sin la etiqueta de afinidad deca-His del terminal C
SEQ ID NO: 66:	NG-605 (EnAd-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP) sin la etiqueta de afinidad deca-His
SEQ ID NO: 67:	NG-606 (EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP) sin la etiqueta de afinidad deca-His
SEQ ID NO: 68	Secuencia de ácido nucleico de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (OKT3)
SEQ ID NO: 69:	Secuencia de ácido nucleico de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (aCD3)
SEQ ID NO: 70:	Casete de transgén NG-611
SEQ ID NO: 71:	Casete de transgén NG-612
SEQ ID NO: 72:	Casete de transgén NG-613
SEQ ID NO: 73:	Casete de transgén NG-614
SEQ ID NO: 74:	Casete de transgén NG-617
SEQ ID NO: 75:	Secuencia de aminoácidos de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (OKT3)
SEQ ID NO: 76:	Secuencia de aminoácidos de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (aCD3)
SEQ ID NO: 77:	Genoma NG-611
SEQ ID NO: 78:	Genoma NG-612
SEQ ID NO: 79:	Genoma NG-613
SEQ ID NO: 80:	Genoma NG-614
SEQ ID NO: 81:	Genoma NG-617
SEQ ID NO: 82:	Genoma NG-615
SEQ ID NO: 83:	Genoma NG-640
SEQ ID NO: 84:	Genoma NG-641
SEQ ID NO: 85:	Secuencia nula
SEQ ID NO: 86:	Secuencia de ácido nucleico Flt3L
SEQ ID NO: 87:	Secuencia nula
SEQ ID NO: 88:	Secuencia de ácido nucleico de MIP1 α
SEQ ID NO: 89:	Secuencia ligadora flexible
SEQ ID NO: 90:	Secuencia de ácido nucleico de IFN α
SEQ ID NO: 91:	Secuencia de ácido nucleico de CXCL10
SEQ ID NO: 92:	Secuencia de ácido nucleico de CXCL9
SEQ ID NO: 93:	Casete de transgén NG-615

SEQ ID NO: 94:	Casete de transgén NG-640
SEQ ID NO: 95:	Casete de transgén NG-641
SEQ ID NO: 96:	Secuencia de aminoácidos de FLT3L
SEQ ID NO: 97:	Secuencia de aminoácidos de MIP1 α
SEQ ID NO: 98:	Secuencia de aminoácidos de IFN α
SEQ ID NO: 99:	Secuencia de aminoácidos de CXCL9
SEQ ID NO: 100:	Secuencia de aminoácidos de CXCL10
SEQ ID NO: 101:	Genoma NG-618
SEQ ID NO: 102:	Secuencia de ácido nucleico de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP NG-618
SEQ ID NO: 103:	Casete de transgén NG-618
SEQ ID NO: 104 a 277	son secuencias ligadoras
SEQ ID NO: 278	Genoma NG-616
SEQ ID NO: 279 a 281	son cebadores

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Se diseñaron activadores biespecíficos de linfocitos T recombinantes y se produjeron proteínas como se describe en este ejemplo.

1.1 Ingeniería genética del activador biespecífico de linfocitos T

Los activadores biespecíficos de linfocitos T se generan al unir dos fragmentos de anticuerpo de cadena única (ScFv) de diferentes especificidades con un ligador Gly₄Ser flexible. Los ScFv se crean mediante la unión de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales parentales por parte de un ligador. Cada activador biespecífico de linfocitos T se diseñó con una secuencia de señal del terminal N para la secreción mamífera y una etiqueta de afinidad de decahistidina del terminal C para la detección y la purificación. Los activadores biespecíficos de linfocitos T se diseñaron por ingeniería genética mediante técnicas estándar de clonación de ADN y se insertaron en vectores de expresión de proteínas (Figura 1).

El activador biespecífico de linfocitos T anti-FAP se creó *de novo* mediante el uso del ScFv anti-FAP de la patente WO2010037835A2 y el anti-CD3 ScFv de la patente WO 2005040220 (SEQ ID 63 en esta), con una secuencia de señal y una etiqueta de afinidad agregadas.

Un activador biespecífico de linfocitos T de control utilizó el anti-FHA (hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis*) ScFv de Hussein et al, 2007 (Hussein AH et al (2007) "Construction and characterization of single-chain variable fragment antibodies directed against the Bordetella pertussis surface adhesins filamentous hemagglutinin and pertactin". Infect Immunity **75**, 5476-5482) y el anti-CD3 ScFv de la patente WO 2005040220 (SEQ ID NO: 63 en esta), con una secuencia de señal y una etiqueta de afinidad agregadas.

1.2 Producción de activador biespecífico de linfocitos T recombinante

Las proteínas de activador biespecífico de linfocitos T recombinantes se produjeron al clonar las secuencias respectivas en el vector pSF-CMV mediante un promotor de CMV (SEQ ID NO: 24) para dirigir la expresión de proteínas (Figura 1). La concentración de ADN de plásmido para plásmidos, pSF-CMV- activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y pSF-CMV-activador biespecífico de linfocitos T de control (Tabla 2), se midió mediante NanoDrop. El vector pSF-CMV vacío se incluye como un control negativo. Se diluyeron 54,7 µg de cada uno con 4 ml de OptiMEM. Se diluyeron 109,2 µg de PEI (lineal, MW 25000, Polysciences, EE. UU.) en 4 ml de medio OptiMEM y se mezclaron con los 4 ml de ADN diluido para generar complejos

ADN-PEI (relación ADN:PEI de 1:2 (p/p)). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, la mezcla del complejo se completó a 18 ml con OptiMEM, y esta mezcla de transfección se agregó a un matraz T175 que contenía células Ad293 a una confluencia del 90 %. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron 30 ml de medios celulares (alta glucosa de DMEM con glutamina complementada, libre de rojo fenol) a las células, y los matraces se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂, durante 48 horas. Otro matraz de células se transfectó en paralelo con pSF-CMV-GFP para asegurar una eficacia de transfección eficaz. Para recolectar la proteína segregada, se recolectó el sobrenadante de las células transfectadas y se centrifugó a 350 g a 4°C durante 5 minutos para eliminar los componentes celulares (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Los sobrenadantes se transfirieron a unidades de filtro centrifugas Amicon Ultra-15 MWCO 10k (Millipore). Después de girar a 4750 rpm y 4 °C, el volumen del retentato se ajustó con el flujo continuo para obtener una concentración 50 veces mayor. Las alícuotas de proteína concentrada se almacenaron a -80 °C.

Tabla 2

La "p" empleada como prefijo para nombrar constructos indica que el constructo es un plásmido.

ID del plásmido	[ADN de plásmido] ng/ml
pSF-CMV-activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP	6700
pSF-CMV-activador bienespecífico de linfocitos T de control	5300
pSF-Lenti-FAP	659,6

1.3 Producción de virus que expresan activadores bienespecíficos de linfocitos T dirigido a FAP en combinación con proteínas inmunomoduladoras

Se generaron tres virus (NG-640, NG-641 y NG-615) que codifican una molécula de activador bienespecífico de linfocitos T dirigida a FAP y 2 o 3 proteínas inmunomoduladoras (Tabla 1). NG-640 codifica tres proteínas transgénicas, la molécula de activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y las quimiocinas CXCL9 y CXCL10. NG-641 y NG-615 codifican cuatro proteínas transgénicas. NG-641 codifica el activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, las quimiocinas CXCL9 y CXCL10 y la citocina IFN α y NG-615 codifica el activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, la quimiocina MIP1 α y las citocinas ligando FLT3 e IFN α . También se generó un virus que codifica solo la molécula de activador bienespecífico de linfocitos T

dirigido a FAP (NG-617)

Tabla 1

ID del virus	Casete de transgén
NG-615 (SEQ ID NO: 1)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -E2A ³ -Flt3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1α ⁶ -T2A ⁷ -IFNα ⁸ -PA ⁹
NG-640 (SEQ ID NO: 2)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -PA ⁹
NG-641 (SEQ ID NO: 3)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -E2A ³ -IFNα ⁸ -PA ⁹
NG-617 (SEQ ID NO: 4)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -PA ⁹

En cada casete de transgén, el cADN que codifica el activador biespecífico de linfocitos T y otras proteínas inmunomoduladoras estaba flanqueado en el extremo 5' con una secuencia aceptora de empalme corto (SSA, CAGG) y en el extremo 3' con una secuencia de poli(A) tardía SV40 (PA, SECUENCIA ID NO: 25). Las secuencias de cADN para cada transgén se separaron usando secuencias peptídicas autoescindibles de alta eficiencia 2A (P2A, T2A, E2A, SECUENCIA ID NO: 50, 53 y 52).

Producción del virus

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los plásmidos pNG-615, pNG-640 y pNG-641 mediante la inserción directa de casetes de transgén sintetizados (SEQ ID NO: 93, 94 y 95 respectivamente). NG-615 contiene cuatro transgenes que codifican un activador biespecífico de linfocitos T que se dirige a FAP (SEQ ID NO: 102), Flt3L (SEQ ID NO. 86), MIP1α (SEQ ID NO. 88) y IFNα (SEQ ID NO. 90). NG-640 y NG-641 codifican un activador biespecífico de linfocitos T que se dirige a FAP (SEQ ID NO. 102), CXCL9 (SEQ ID NO. 92) y CXCL10 (SEQ ID NO. 91), NG-641 también contiene un cuarto transgén que codifica IFNα (SEQ ID NO. 90). Los esquemas de los casetes de transgén se muestran en la Figura 1. La construcción del ADN de plásmido se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación del ADN.

Los plásmidos, pNG-615, pNG-640 y pNG-641, se alinearon mediante digestión de restricción con la enzima Ascl para producir los genomas virales. Los virus se amplificaron y se purificaron de acuerdo con los métodos proporcionados a continuación.

El ADN digerido se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y se precipitó durante 16 horas, -20 °C en 300 µl > 95 % de etanol de grado de biología molecular y 10 µl de acetato de sodio 3M. El ADN precipitado se convirtió en pélets mediante centrifugación a 14000 rpm, 5 minutos y se lavó en 500 µl de etanol al 70 %,

antes de centrifugar nuevamente, 14000 rpm, 5 minutos. Los pélets de ADN limpio se secaron al aire, se volvieron a suspender en 500 µl de OptiMEM que contenía 15 µl de reactivo de transfección de lipofectamina y se incubaron durante 30 minutos, temperatura ambiente. La mezcla de transfección se agregó luego por goteo a un matraz T-25 que contenía células 293 cultivadas hasta un 70 % de confluencia. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección durante 2 horas a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron 4 ml de medios celulares (alta glucosa de DMEM con glutamina complementada con FBS al 2 %) a las células, y los matraces se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂.

Las células 293 transfectadas se monitorearon cada 24 horas y se complementaron con medios adicionales cada 48-72 horas. La producción del virus se monitoreó mediante observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa celular. Una vez que se observó CPE extenso, el virus se recolectó de células 293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Los virus recolectados se usaron para volver a infectar células 293 con el fin de amplificar las reservas de virus. La producción viable de virus durante la amplificación se confirmó por observación de CPE significativo en la monocapa celular. Una vez que se observó CPE, el virus se recolectó de células 293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Las reservas amplificadas de los virus se usaron para una amplificación adicional antes de que se purificaran los virus mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir reservas de virus purificados.

Ejemplo 2: Análisis de replicación de virus y actividad oncolítica.

Replicación del virus

Se utilizaron líneas celulares de carcinoma de pulmón (A549), de mama (MDA-MB-453) o de vejiga (RT4) inoculadas durante 72 horas con 1ppc NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, enadenotucirev (EnAd) o no infectado para la cuantificación de ADN viral mediante qPCR. Los sobrenadantes celulares se recolectaron y se clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. Se utilizaron 50 µL de sobrenadante para el análisis de ADN.

El ADN se extrajo de muestra de sobrenadante con el kit Qiagen DNeasy, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó una curva estándar con partículas del virus EnAd (2.5e10-2.5e5vp) y se extrajo con el kit DNeasy. Cada muestra o estándar extraído se analizó mediante qPCR con un conjunto de sonda-cebador específico del gen viral para el gen E3 temprano. La cuantificación de la cantidad de genomas de virus detectados por célula demostró la replicación viral en

A549, MDA-MB-453 y RT4 para todos los virus evaluados (NG-617, NG-615, NG-640 y NG-641) (Figura 2). La replicación viral fue similar para todos los virus y fue equivalente a la del virus EnAd parental. No se pudieron detectar genomas virales en células no infectadas.

Actividad oncolítica

Las células de carcinoma de pulmón (A549) inoculadas con 100 ppc de NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, EnAd o no infectadas se monitorearon utilizando un analizador de células en tiempo real (RTCA) xCELLigence. La proliferación celular se controló cada 60 minutos durante hasta 96 horas. La oncólisis de las células se evaluó mediante el cálculo del tiempo de inactivación 50 (KT50), que es el momento en que se alcanza el 50 % de lisis (Figura 3). Estos datos mostraron un KT50 equivalente en todos los virus evaluados, incluido el virus EnAd parental. No se observó ningún efecto oncolítico en las células no tratadas.

En conjunto, estos datos indican que la inclusión de un activador biespecífico de linfocitos T y dos o tres transgenes inmunomoduladores no afecta significativamente la actividad replicativa u oncolítica del virus EnAd.

Ejemplo 3: Análisis de la expresión de transgén mediada por virus - Detección de activador biespecífico de linfocitos T recombinante

Para detectar el activador biespecífico de linfocitos T, la etiqueta de afinidad de decahistidina del terminal C se puede sondear con un anticuerpo anti-His mediante la técnica de transferencia Western. Las muestras de proteínas se ajustaron con un amortiguador de lisis hasta un volumen final de 15 μ L que incluye 2,5 μ L de amortiguador de muestra SDS Laemmli 6x que contiene β -mercaptoetanol y SDS. Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar las proteínas y se cargaron en geles de poliacrilamida prefundidos 10 % de 15 cavidades (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BioRad, Reino Unido). Los geles se ejecutaron a 180 V durante 45 minutos en 1 x amortiguador de corrida dentro de un sistema Tetra Mini-PROTEAN (BioRad, Reino Unido). Las proteínas de los geles de SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia húmeda a 300 mA y 4 °C durante 90 minutos en 1 x amortiguador de transferencia dentro de una célula mini Trans-Blot (BioRad, Reino Unido). La transferencia se realizó en presencia de una bolsa de hielo para limitar el calor. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó luego con leche al 5 % en PBS-T en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente y se sondeó con el anticuerpo anti-His (terminal C) (ratón α -6xHis, clon 3D5, Invitrogen, Reino Unido, N.º 46-0693), diluido a 1:5000 en PBS/leche al 5%. Después de la

incubación en un agitador durante toda la noche a 4 °C, la membrana se lavó y se sondeó con anticuerpo α -ratón-inmunoglobulina secundario policlonal etiquetado con HRP (1:10.000 en PBS/leche al 5 %, Dako, N.º P0161) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para la visualización, se aplicó el sustrato de duración prolongada SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se expuso a una película de rayos X y se reveló en un procesador de película automático. Los resultados demostraron la expresión y secreción de la proteína de activador biespecífico de linfocitos T de las células Ad293 transfectadas con los plásmidos de expresión de activador biespecífico de linfocitos T, pero no el vector parental.

Cuantificación de activador biespecífico de linfocitos T recombinante

Para medir la cantidad de proteína de activador biespecífico de linfocitos T recombinante, se usó la técnica de transferencia en mancha para comparar la señal de activador biespecífico de linfocitos T con una proteína estándar etiquetada con His (terminal C 10His) (10 x catepsina D humana etiquetada con His, Biolegend, N.º 556704). Se prepararon diluciones en serie de dos veces de muestras de activador biespecífico de linfocitos T y proteína estándar, y se aplicaron 1,5 μ L de cada una directamente a una membrana de nitrocelulosa y se secaron al aire durante 20 minutos. Luego se realizó el protocolo de bloqueo y tinción descrito anteriormente para la transferencia Western. La concentración molar de la proteína estándar se ajustó para representar una concentración de activador biespecífico de linfocitos T de 250 μ g/mL. Los resultados (Figura 13A) demostraron la expresión y secreción de la proteína de activador biespecífico de linfocitos T de las células Ad293 transfectadas con los plásmidos de expresión de activador biespecífico de linfocitos T.

ELISA de fijación a FAP

La actividad de fijación a FAP del activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y el activador biespecífico de linfocitos T de control (anti-FHA) (SEQ ID NO: 2 y 4) segregados de células transfectadas con pSF-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o pSF-CMV-activador biespecífico de linfocitos T de control se evaluó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Se incluyeron los sobrenadantes del vector pSF-CMV vacío como un control negativo. Se prepararon placas ELISA (microplaca de 96 cavidades Nunc Immuno MaxiSorp) al recubrirlas durante la noche a 4 °C con proteína FAP/seprasa humana (100 ng/cavidad, Sino Biological Inc, 10464-H07H-10) en amortiguador PBS. Las placas se lavaron entre todas las etapas de fijación posteriores con Tween 20 al 0,05 % en PBS.

Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 5 % en Tween 20 al 0,05 % en PBS. Las alícuotas de la proteína de activador biespecífico de linfocitos T, o la proteína recolectada de cavidades transfectadas con el vector pSF-CMV vacío, se diluyeron 10 veces en PBS/BSA al 5%/Tween 20 al 0,05 %. Todas las muestras se agregaron a las placas recubiertas con FAP y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección, anticuerpo anti-His (terminal C) (ratón anti-6xHis, clon 3D5, Invitrogen, Reino Unido, N.º 46-0693), se diluyó a 1:1000 y se aplicó durante 1 hora a temperatura ambiente. La HRP conjugada anti-Fc de ratón (1:1000 en PBS/leche al 5 %, Dako) se aplicó luego durante 1 hora a temperatura ambiente antes de que la detección de HRP se realizara con la solución de sustrato de HRP 3.3.5.5'-terametilendiamina (TMB, Thermo-Fisher). La solución de detención se usó para terminar la reacción, y el color desarrollado se midió a 450 nm en un lector de placas. La absorbancia a 450 nm se graficó para activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, activador biespecífico de linfocitos T de control y sobrenadantes del vector vacío, lo que demuestra la fijación específica del activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP a la proteína FAP. Los resultados (Figura 13B) muestran la fijación específica del activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y no el activador biespecífico de linfocitos T de control a la proteína FAP recombinante.

Expresión de transgén evaluada mediante ELISA

La expresión de los transgenes de quimiocina o citocina, IFN α , MIP1 α , FLT3L, CXCL10 y CXCL9 se evaluó mediante ELISA. Las líneas celulares de carcinoma A549 y RT4 se inocularon con 1ppc de NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, EnAd o no se infectaron por hasta 7 días. A los 4 días y 7 días después de la inoculación, se clarificaron los sobrenadantes celulares y se evaluó la expresión de transgén mediante ELISA.

El ELISA de IFN α se llevó a cabo utilizando el kit Verikine IFN alpha humano (ciencia de ensayo Pbl), el ELISA de MIP1 α se realizó utilizando el kit ELISA de CCL3 Quantikine humano (sistemas R y D), el ELISA de Flt3L se realizó utilizando el kit ELISA de Flt3L humano (Abcam), el ELISA de CXCL9 se llevó a cabo utilizando el kit ELISA de CXCL9 humano (Abcam) y el ELISA de CXCL10 se realizó utilizando el kit ELISA de CXCL10 humano (Abcam). Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Las concentraciones de IFN α , MIP α , Flt3L, CXCL9 y CXCL10 segregados se determinaron mediante la interpolación de las curvas estándar. La expresión de IFN α ,

MIP1 α y Flt3L podría detectarse en el sobrenadante celular de las células tratadas con NG-615, IFN α , CXCL9 y CXCL10 podrían detectarse en los sobrenadantes de las células tratadas con NG-641, y CXCL9 y CXCL10 podrían detectarse en los sobrenadantes de NG-640 células tratadas (Figuras 4 y 5). No se detectó expresión alguna de transgén de quimiocinas o citocinas en células de control tratadas o no tratadas con EnAd.

Expresión de transgén funcional evaluada mediante un ensayo informador a base de células

La expresión de los transgenes funcionales de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP e IFN α se evaluó en ensayos usando una línea celular indicadora Jurkat-Dual (Invivogen). Esta es una línea celular de linfocitos T inmortalizados humanos (Jurkat) transformada mediante la integración estable de dos constructos indicadores inducibles. Una de las construcciones informadoras inducibles permite estudiar la activación α de IFN- α de la vía del factor regulador de interferón (IRF) a través de la secreción y la actividad de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP, mientras que la segunda es un indicador de luciferasa secretada sensible a NF- κ B que está activo mediante señalización a través del receptor de linfocitos T. La actividad de SEAP es proporcional al nivel de IFN- α presente en el sobrenadante y se puede medir mediante la detección de la degradación inducida mediante SEAP del sustrato Quanti-Blue™. La expresión de MIP1 α funcional se evaluó mediante el uso de una línea celular indicadora CCR5 (CHO-K1 CCR5 β -arrestina, Invivogen). Las líneas celulares de carcinoma A549 se inocularon con 1ppc de NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, EnAd o no se infectaron. A los 2, 3 o 4 días después de la inoculación, se recolectaron los sobrenadantes celulares y se aclararon para su análisis.

Para evaluar la función IFN α , se agregaron 20 μ L de cada sobrenadante, diluido 1:10, 1:50 o 1:250 en medio de cultivo, a células Jurkat Dual (2×10^5 células/cavidad) y se incubaron durante 16-20 horas. Los sobrenadantes se recolectaron de las placas y se trataron con 200 μ L de reactivo Quanti-Blue™ durante 1 hora. Las placas se analizaron utilizando un lector de microplacas que mide la absorbancia (Abs) a 640 nm. Las respuestas que demuestran la presencia de IFN α funcional podrían detectarse en sobrenadantes de células de carcinoma tratadas con NG-615 y NG-641, pero no con controles tratados con EnAd o no infectados con NG-640, NG-617, EnAd (Figura 6A). El nivel de IFN α funcional detectado estaba en niveles similares en los sobrenadantes tratados con NG-615 y NG-641.

Para evaluar la función de MIP1 α , se sembraron células indicadoras CCR5 (5×10^3 células/cavidad) y se incubaron durante 20-24 horas. Luego se agregaron 5 μ l de sobrenadante de las células tumorales tratadas a cada cavidad y se incubaron durante 90 minutos. La actividad del indicador de luciferasa se detectó luego con una solución de detección y cuantificación en un lector de placa de luminiscencia. Se detectaron respuestas que demostraban la presencia de MIP1 α funcional en sobrenadantes de células de carcinoma tratadas con NG-615 y sobrenadantes de células tratadas con un virus de control positivo conocido por expresar MIP1a, NG-347 (Figura 6B).

Para evaluar la función activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, se sembraron células de fibroblastos de pulmón MRC-5 (que expresan FAP en su membrana celular) (2×10^4 células/cavidad) y se incubaron durante 4 horas para permitir que las células se adhirieran a las placas. Se agregaron células Jurkat-Dual (2×10^5 células/cavidad) a las cavidades junto con 20 μ l de sobrenadante de las células tumorales tratadas. Las placas se incubaron durante 16-20 horas. Los sobrenadantes se recolectaron y se trataron con 50 μ l de reactivo Quanti-Luc antes de leer inmediatamente las placas en un lector de placas para detectar la actividad de la luciferasa. Se detectaron respuestas que demostraban la presencia de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP funcional en los sobrenadantes de células de carcinoma tratadas con NG-617, NG-615, NG-640 y NG-641, pero no con sobrenadantes de control tratados o no tratados con EnAd (Figura 7). Sorprendentemente, dados los niveles similares de IFN α producidos por NG-615 y NG-641, los sobrenadantes de las células tratadas con NG-615 tuvieron niveles significativamente más bajos de expresión funcional de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP en comparación con todos los demás virus que expresan activadores biespecíficos de linfocitos T evaluados, que incluían el otro virus que contiene 4 transgenes, NG-641.

Ejemplo 2

Las actividades funcionales de las proteínas de activador biespecífico de linfocitos T recombinantes se evaluaron en varios ensayos diferentes antes de construir los virus EnAd que tienen el transgén de activador biespecífico de linfocitos T.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas

Las PBMC humanas se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de muestras de sangre humana frescas de donantes sanos o de conos de

leucocitos de sangre, obtenidos del NHS Blood and Transplant UK en Oxford. En cualquier caso, las muestras se diluyeron a 1:2 con PBS, y 25 ml de esta mezcla se colocaron en capas en 13 mL de Ficoll (1.079 g/ml, Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) en un tubo Falcon de 50 ml. Las muestras se centrifugaron (Allegra X-15R, Beckman Coulter) a 1600 rpm durante 30 minutos a 22 °C con el ajuste de desaceleración más bajo para conservar la separación de fases. Después de la centrifugación, se pudieron observar 4 capas que incluían una capa de plasma en la parte superior, seguida de una interfaz que contenía PBMC, una capa de Ficoll y una capa de glóbulos rojos y granulocitos en la parte inferior. Las PBMC se recolectaron con una pipeta Pasteur y se lavaron dos veces con PBS (1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente) y se volvieron a suspender en medio RPMI complementado con FBS al 10 %.

Aislamiento de linfocitos T positivos para CD3

Los linfocitos T positivos para CD3 (CD3⁺) se extrajeron de las PBMC mediante disminución de los linfocitos que no son CD3 con un kit de aislamiento de linfocitos T Pan (Miltenyi Biotec, N° 130-096-535), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Procesamiento de muestras de ascitis primaria

Las muestras de ascitis humana primaria se recibieron del sector de oncología del Hospital Churchill (Oxford University Hospitals) de pacientes con múltiples indicios, que incluyen, entre otros, cáncer gástrico, de ovario, de páncreas y de mama. Al recibirlas, se separaron las fracciones celulares y de fluidos, con alícuotas de fluido congelado a -20 °C para su almacenamiento y futuro análisis. La fracción celular se trató con amortiguador de lisis de glóbulos rojos (Roche, N° 11814389001) para eliminar los glóbulos rojos, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los tipos de células presentes en cada muestra se determinaron mediante tinción para EpCAM, EGFR, FAP, CD45, CD11b, CD56, CD3, CD4, CD8, PD1 y CTLA4 y se analizaron mediante citometría de flujo. Luego, se usaron células nuevas para la activación de linfocitos Tex vivo y los experimentos de lisis de células diana. En algunos casos, las células se pasaron en DMEM complementado con FBS al 10 % para usar en experimentos posteriores.

Mantenimiento de la línea celular

Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM (Sigma-Aldrich, Reino Unido) o RPMI (Sigma-Aldrich, Reino Unido) como se especifica en la Tabla 3, complementado con suero fetal bovino al 10 % (v/v) (FBS, Gibco™) y penicilina/estreptomicina al 1 % (v/v) (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Reino Unido), en una incubadora humidificada (MCO-17AIC, Sanyo) a 37 °C y 5 % de CO₂, a menos que se

especifique lo contrario. Las células se separaron cada 2 a 3 días antes de alcanzar la confluencia por disociación enzimática con tripsina/EDTA (tripsina al 0,05 %, 0,02 % de EDTA, Sigma-Aldrich, Reino Unido). En este proceso, el medio de cultivo se aspiró, y las células se lavaron con 15 ml de PBS y, posteriormente, se trataron las células con 2 ml de tripsina/EDTA durante 2-10 minutos a 37 °C. La tripsina se neutralizó con 10 ml de DMEM que contenía FBS al 10 % y una porción de las células se transfirió a nuevos matraces que contenían medio nuevo. Para el cultivo celular de rutina, los medios se complementaron con FBS al 10 % para infecciones y transfecciones de plásmidos virales con FBS al 2 % y para transfecciones de plásmidos de activador biespecífico de linfocitos T recombinantes sin complemento de FBS.

Tabla 3

Línea celular	Origen de las células	Medios de cultivo	Fuente
Líneas celulares derivadas de ascitis	Ascitis primaria humana	DMEM	NHS Blood & Transplant UK
BTC100	Fibroblastos asociados al cáncer (CAF) de pulmón primarios humanos	DMEM	Universidad de Oxford
CHO-K1	Ovario de hámster chino, adherente	RPMI	ATCC
Líneas celulares estables CHO-K1	Ovario de hámster chino, adherente	RPMI	-
DLD1	Adenocarcinoma colorrectal humano	RPMI	ATCC
HEK 293A	Riñón embrionario humano, adherente	DMEM	ATCC
Líneas celulares estables HEK 293A	Riñón embrionario humano, adherente	DMEM	-
HEK 293T	Riñón embrionario humano, adherente	DMEM	ATCC
MCF-7	Humana, glándula mamaria, mama, adherente	DMEM	ATCC
Fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF)	Fibroblastos dérmicos primarios humanos adultos normales	DMEM	ATCC
SKOV3	Adenocarcinoma de ovario humano	DMEM	ATCC

Estadísticas

En los casos en que se comparaban dos condiciones, se realizaron análisis estadísticos mediante una prueba t. En todos los demás casos, los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de una vía.

Caracterización de la activación de linfocitos T humanos por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante

Se comparó la capacidad del activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP para inducir la activación de linfocitos T en presencia o ausencia de células de

fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). Los linfocitos T CD3⁺ humanos (70.000 linfocitos por cavidad en placas con fondo en forma de U de 96 cavidades) se cocultivaron en soledad o con células NHDF (10:1 T:NHDF) en presencia de medios en soledad o 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. Las células se cocultivaron durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se recolectaron con un amortiguador de disociación celular libre de enzimas (Thermo, N.º 13151014). Los niveles de expresión de CD69 (Figura 14A) y CD25 (Figura 14B) en linfocitos T CD45⁺ se analizaron luego mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo y se representaron como valores de la media geométrica de fluorescencia (gMFI). Se usó anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en placa (7,5 µg/ml) como control positivo para la activación de linfocitos T. El activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP indujo selectivamente la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 en los linfocitos T, lo que indica que fue capaz de activar los linfocitos T.

En un segundo experimento similar, los linfocitos T se evaluaron mediante tinción intracelular de citocinas 6 horas después del cocultivo con células NHDF (200.000 linfocitos CD3⁺ más 40.000 NHDF en cavidades de una placa de 96 cavidades) y 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. Los linfocitos T CD45⁺ se tiñeron intracelularmente para determinar la expresión de IFN γ con Brefeldina A agregada al medio de cultivo 5 horas antes de la recolección. Como un control positivo, los linfocitos T se estimularon con PMA soluble (10 ng/ml) e ionomicina (1 µg/ml). Los resultados mostrados en la Figura 14C indican que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP en presencia de NHDF dio como resultado una cantidad significativamente mayor de linfocitos T que expresan IFN γ en comparación con el activador biespecífico de linfocitos T de control.

Ejemplo 4:

Para evaluar más a fondo la funcionalidad del IFN α producido a partir del transgén en NG-641, se trataron células Jurkat-DualTM con sobrenadantes de células tumorales A549 sin infectar o infectadas con 10 partículas por célula (ppc) de enadenotucirev (EnAd) o NG-641 para 3 días. Para demostrar que la secreción de SEAP era específica de IFN α , se bloqueó IFN mediante la incubación de anticuerpos específicos de IFN α con los sobrenadantes A549 durante 30 minutos antes del tratamiento de la línea celular indicadora Jurkat-Dual y se incluyó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo. Los datos (Figura 8A) muestran

que la actividad del sobrenadante de células tumorales tratadas con NG-641 en el ensayo de indicador Jurkat Dual es inhibida por el anticuerpo α anti-IFN y no el control de isotipo y, por lo tanto, está mediada por IFN α . Se usó un sistema de ensayo de indicador diferente para evaluar la funcionalidad de los transgenes de quimiocinas CXCL9 y CXCL10 en NG-641. Este ensayo utilizó una línea celular indicadora de β -arrestina de PathHunter que expresaba CXCR3, el receptor para ambas quimiocinas (Eurofins). La activación de GPCR después de la fijación de CXCL9/10 a CXCR3 expresada por estas células conduce al reclutamiento de β -arrestina al receptor que se mide con un ensayo de ganancia de señal que se basa en la tecnología de Complementación de Fragmentos de Enzimas (EFC). Las células indicadoras de β -arrestina CXCR3 de PathHunter se trataron con sobrenadantes de células tumorales A549 no infectadas o infectadas con 10 partículas por célula (ppc) de EnAd o NG-641 durante 3 días. La concentración de CXCL9/10 en el sobrenadante es proporcional a la luminiscencia en el ensayo. Para demostrar que la activación de GPCR era específica de CXCL9/10, se bloquearon CXCL9 y CXCL10 mediante la incubación de anticuerpos específicos de CXCL9/10 con los sobrenadantes de A549 durante 30 minutos antes del tratamiento de las células de β -arrestin de PathHunter. Los datos que se muestran en la Figura 8B muestran una mayor actividad de las células indicadoras CXCR3 en presencia de sobrenadantes de células tumorales tratadas con NG-641 en comparación con EnAd o controles no infectados, y que este aumento está bloqueado por los anticuerpos contra CXCL9/10.

Como medida alternativa de la funcionalidad de las quimiocinas, la capacidad de las quimiocinas para regular de manera descendente la expresión de la superficie celular de sus receptores específicos se usó como base de un ensayo, que evaluó los niveles del receptor CXCR3 en linfocitos T humanos activados anti-CD3/CD28. Células tumorales A549 no se infectaron o se infectaron con 1 partícula viral por célula (ppc) de enadenotucirev (EnAd) o NG-641 durante 7 días y se recolectaron los sobrenadantes. Los linfocitos T activados se trataron luego con los sobrenadantes durante 30 minutos y se midieron los niveles de CXCR3 mediante citometría de flujo, con datos trazados como intensidad de fluorescencia media (MFI). Para demostrar que la regulación descendente de la superficie celular CXCR3 era específica de CXCL9/10, se bloquearon CXCL9 y CXCL10 mediante la incubación de anticuerpos específicos de CXCL9/10 con los sobrenadantes de células tumorales A549 durante 30 minutos antes del tratamiento de los linfocitos T activados. Los datos que se muestran en la Figura 9 muestran una regulación descendente selectiva de la expresión de CXCR3 en

linfocitos T CD4 y CD8 inducidos por sobrenadantes de células tumorales A549 infectadas con NG-641, y este efecto fue abolido por el tratamiento previo con anticuerpos anti-CXCL9/10.

Ejemplo 5: Actividad funcional de virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP en cultivos de células tumorales humanas ex vivo

Las muestras de tumores humanos recién extirpados, de escisiones quirúrgicas planificadas, proporcionadas a través de un biobanco con plena aprobación ética, se picaron inicialmente con tijeras y un bisturí y luego se generaron suspensiones de células individuales con un disociador de tejidos GentleMAC (Miltenyi Biotec). Se descubrió que estas preparaciones celulares no separadas comprenden células tumorales, fibroblastos y diferentes células inmunitarias, que incluían linfocitos T, y se usaron para evaluar la capacidad de los virus para infectar las células tumorales primarias, producir sus transgenes codificados y activar los linfocitos T infiltrantes de tumor también presentes en los cultivos. Las células se volvieron a suspender en medio de cultivo que consistía en mezcla de nutrientes Ham's F-12, suplemento GlutaMAX™ (Gibco), 1x Insulina-Transferina-selenio-etanolamina (ITS-X) (Gibco), anfotericina B 2,5 mg/ml (Gibco™), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 mg/ml, piruvato de sodio y 10 % de FBS, y se colocaron en placas a $\sim 1 \times 10^6$ células/ml en placas de 96 cavidades (0,25 ml de volumen final) o placas de 24 cavidades (0,5 ml de volumen final). Se inocularon con EnAd, NG-615, NG-617, NG-640 o NG-641 a 1000ppc, o se dejaron sin tratar (UIC). Como control positivo de activación de linfocitos T, algunas cavidades también fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 cada uno a 2 μ g/ml. Las células se cultivaron en cavidades duplicadas durante 72 h, luego se recolectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de diferentes citocinas producidas con kits que se basan en microesferas fluorescentes de múltiples citocinas (LEGENDplex™) y un citómetro de flujo. Se analizaron tres muestras de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPNM) (T016, T017, T024), una muestra de metástasis hepática colorrectal (CRC) y una de carcinoma de células renales (RCC). En línea con los datos de expresión de transgén en las Figuras 4-6, se produjo IFN α selectivamente en cultivos tratados con NG-615 y NG-641 (Figura 10A). El ligando Flt3 (FLT3L) se detectó fácilmente después del tratamiento con NG-615, pero solo se detectaron niveles muy bajos con otros virus, y estos niveles fueron similares a los inducidos por la activación de los linfocitos T con anti-CD3/28, lo que indica que el Flt3L en cultivos de NG-615 fue el producto transgénico. Los resultados para otras citocinas mostraron que, al igual que con el

estudio de inoculación de líneas celulares tumorales descrito en el Ejemplo 3 (Figura 7), la inoculación de NG-615 conduce a niveles mucho más bajos de activación de linfocitos T que los otros virus NG-617, NG-640 que codifican activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y el otro virus NG-641 portador de 4 transgenes, como se muestra para IFN γ , TNF α , IL-17, Granzyme B e IL-13 en la Figura 10B.

La activación de los linfocitos T tumorales endógenos en un cultivo de células tumorales de NSCLC extirpado también se midió mediante citometría de flujo, que evaluó los niveles de los marcadores de activación de linfocitos T CD25, CD69 y CD107a, así como la expresión de citocinas intracelulares (IFN γ y TNF α) por linfocitos T CD4 y CD8 después de 3 días de cultivo. Como se muestra en la Figura 11A-D, EnAd tuvo poco efecto sobre los marcadores de activación o la expresión de citoquinas, mientras que los tratamientos con NG-617, NG-640 y NG-641 condujeron a la regulación ascendente de todos estos valores medidos de activación de linfocitos T. Los niveles similares de activación observados con los virus que portan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP están en línea con los datos de citocinas descritos anteriormente (Figura 10B)

Ejemplo 6

En este ejemplo, se evaluó la capacidad de los linfocitos T activados con activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante para inducir la muerte de las células diana de fibroblastos.

El activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP induce la lisis mediada por linfocitos T de líneas celulares positivas para FAP y células primarias

Las NHDF (7.000 células) se cocultivaron con 70.000 linfocitos T en cavidades de una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades en presencia de medios solos o 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. Después de 24 horas de cocultivo, los sobrenadantes se recolectaron y la citotoxicidad se determinó mediante un ensayo de LDH de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados que se muestran en la Figura 15A muestran que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP aumentó significativamente la lisis de las células NHDF.

En un experimento similar, 7.000 células de fibroblastos primarios de pulmón (BTC100) se cocultivaron con 70.000 linfocitos T CD3⁺ con o sin 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. Después de 24 horas de cocultivo, los sobrenadantes se recolectaron y la citotoxicidad se determinó mediante un ensayo de LDH. Los

resultados en la Figura 15B y C muestran que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP aumentó significativamente la lisis de las células de fibroblastos asociados al cáncer (CAF) humanos primarios. La expresión de FAP por estas y otras líneas celulares derivadas de pacientes se muestra en la Figura 16.

La relación dosis-respuesta para la lisis celular mediada por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP se evaluó mediante el cocultivo de 8.000 células NHDF con 40.000 linfocitos T y concentraciones de activador biespecífico de linfocitos T que oscilaron de 2×10^3 a 2×10^{-2} ng/ml. Después del cocultivo durante 24 horas a 37 °C, se realizó un ensayo de LDH en sobrenadantes para determinar la citotoxicidad de las células diana. Las curvas de respuesta a la dosis se ajustaron mediante un modelo de ajuste no lineal de cuatro parámetros integrado en GraphPad Prism, lo que genera un valor EC50 para el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP de 3,2 ng/ml. Los resultados (Figura 17A) muestran una relación dependiente de la dosis entre la concentración de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y la citotoxicidad, según lo medido por el ensayo de LDH (se muestra como Ab₄₉₀).

Ejemplo 7

Las líneas celulares CHO y Ad293 estables que expresan FAP se generaron como un medio para demostrar la especificidad del antígeno FAP del activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP en comparación con las células no transfectadas parentales.

Generación de líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan FAP

La secuencia de proteínas del gen FAP se obtuvo de la base de datos NCBI (SEQ ID 23), se transcribió de manera inversa para generar una secuencia codificante de ADN que fue sintetizada por Oxford Genetics Ltd (Oxford, Reino Unido). El gen FAP se clonó en el vector pSF-Lenti mediante técnicas de clonación estándar que producen el vector pSF-Lenti-FAP. Las células HEK293T se transfectaron con el vector de expresión de FAP lentivirus junto con pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev. La lipofectamina 2000 se utilizó como reactivo de transfección y se agregó al ADN vector en una relación ADN:lipofectamina de 1:2, y se incubó con las células a 37 °C. El sobrenadante que contenía lentivirus se recolectó 48 horas más tarde y se mezcló con polibreno (concentración final, 8 µg/ml). La mezcla de lentivirus/polibreno se agregó a células Ad293 o CHO sembradas y se incubó a 37 °C. El día 4, el sobrenadante se intercambió por medios que contenían puromicina (2

µg/ml para Ad293 y 7,5 µg/ml para CHO). Las variantes estables se seleccionaron luego por clonación, y la expresión de FAP de las líneas celulares parentales o la variante transfectada de manera estable se determinó mediante tinción con FAP o anticuerpo de control de isótopos y se analizó mediante citometría de flujo (Figura 18A).

La lisis de células diana mediada por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP es específica para las células que expresan FAP

Las células CHO o CHO-FAP (7.000 células) se cocultivaron en soledad o con linfocitos T humanos (70.000) en presencia de medios en soledad o con 2 µg/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control en cavidades de una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades. Después de 24 horas de incubación, se recolectaron los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad de las células diana mediante el ensayo de citotoxicidad LDH como se describe en el Ejemplo 4 (Figura 18B). La activación de los linfocitos T también se determinó al analizar los niveles de expresión de CD69 y CD25 mediante citometría de flujo (Figura 19). La citotoxicidad se observó solo cuando las células CHO-FAP se cultivaron con linfocitos T y activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP. Esto indica que la activación de linfocitos T mediada por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y la lisis de las células diana son altamente específicas y se limitan a las células que expresan FAP, y no a la línea celular parental negativa para FAP.

Ejemplo 8

En un experimento adicional, se evaluó la capacidad de la proteína de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante para activar los linfocitos T CD4 o CD8 y la capacidad de cada uno de estos subconjuntos de linfocitos T para lisar células NHDF. Los linfocitos T CD3⁺ (35.000) se cocultivaron con 7.000 células NHDF en presencia de 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control en cavidades de una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las células se recolectaron y se tiñeron con anticuerpos contra CD4 o CD8 y CD69 y CD25, y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados (Figura 20A) demostraron que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP indujo un aumento en los marcadores de activación CD69 y CD25 en los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

En un experimento similar, se evaluó la capacidad de cada subconjunto de

linfocitos T (CD4 y CD8) para inactivar células diana. Los linfocitos T CD4⁺ se extrajeron de las células purificadas con CD3 mediante selección positiva con un kit de aislamiento de linfocitos T CD4 (Miltenyi Biotec, N.º 130-045-101), de acuerdo con el protocolo del fabricante, con los linfocitos CD8 dentro del flujo continuo no aislado. En las cavidades de una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades, 7.000 NHDF se cocultivaron con 35.000 linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ junto con 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control y se incubaron a 37 °C. Después de 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad de las células diana mediante el ensayo de citotoxicidad de LDH. Los resultados (Figura 20B) muestran que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP indujo a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ a inactivar las células NHDF.

Ejemplo 9

Caracterización de la activación mediada por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP de linfocitos autólogos asociados a tumores de ascitis maligna primaria

Para evaluar la actividad de las proteínas de activador biespecífico de linfocitos T mediante el uso de células derivadas de pacientes con cáncer, se obtuvieron muestras de fluidos de ascitis maligna primaria que contienen tanto linfocitos T CD3⁺ como células FAP⁺ para realizar pruebas. Se sembraron células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde el momento en que se recibieron) a 250.000 células por cavidad de una placa de 96 cavidades con fondo en forma de U, ya sea en fluido de ascitis al 100 % o en medio complementado con suero humano al 1 % en presencia de 500 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control. Las cavidades sin tratar sirvieron como controles negativos. Después de la incubación a 37 °C durante 5 días, se recolectó la población celular total y se determinó la cantidad de linfocitos T CD3⁺ (Figura 21A) y los niveles de expresión de CD25 en linfocitos T CD3⁺ (Figura 21B). La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de microesferas de recuento de precisión. Los resultados demuestran que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP produjo un aumento significativo en la activación de linfocitos T de los linfocitos T asociados a tumores de pacientes con cáncer.

Como una extensión del experimento anterior, se recolectaron cavidades de replicación y se determinó la cantidad de células FAP⁺ mediante citometría de flujo (Figura 21C). La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de

microesferas de recuento de precisión. Los resultados muestran que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP produjo una disminución significativa en la cantidad de células autólogas que expresan FAP en la muestra de ascitis.

Ejemplo 10

Los virus EnAd que expresan activador biespecífico de linfocitos T recombinante se diseñaron por ingeniería genética, se produjeron y se purificaron mediante los métodos que se describen más adelante.

Generación de Enadenotucirev que expresa activador biespecífico de linfocitos T

El EnAd es un adenovirus quimérico competente de replicación del grupo B que contiene frecuentes sustituciones de nucleótidos no homólogas de Ad3 para Ad11p en la región E2B, una eliminación de E3 casi completa y una eliminación de E4 más pequeña mapeada para E4orf4 (Kuhn et al, Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer, PLoS One, 2008 Jun 18; 3(6): e2409).

Se usó el plásmido pEnAd2.4 para generar los plásmidos ppEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T de control, pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T de control (Tabla 4) mediante la inserción directa de un casete que codifica activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (SEQ ID NO: 1), o activador biespecífico de linfocitos T de control (SEQ ID NO: 3). El casete de transgén contenía una secuencia aceptora de empalme corto 5' CAGG o un promotor de CMV exógeno (SEQ ID NO: 24), la secuencia de cADN del activador biespecífico de linfocitos T EpCAM, activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control y una secuencia de poliadenilación 3' (SEQ ID NO: 25). La construcción del plásmido se confirmó mediante secuenciación de ADN. El promotor de CMV exógeno es constitutivamente activo y, por lo tanto, produce la expresión temprana de transgenes. La secuencia aceptora de empalme impulsa la expresión bajo el control del promotor tardío principal viral y produce la expresión de transgén posterior después del inicio de la replicación genómica del virus.

Tabla 4

ID del plásmido	[ADN de plásmido] ng/ml
pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP	1322,8
pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido	3918,3

a FAP	
pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T de control	189,1
pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T de control	236,2
pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP-RFP	1599
pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP-RFP	1872
pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T de control-RFP	1294
pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T de control-RFP	2082

Producción y caracterización de virus

Los plásmidos EnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T EpCAM, pEnAd2.4-SA-activador biespecífico de linfocitos T EpCAM, pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pEnAd2.4-SA- activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pEnAd2.4-CMV-activador biespecífico de linfocitos T de control, pEnAd2.4-SA- activador biespecífico de linfocitos T de control se alinearon por digestión de restricción con la enzima *Ascl* para producir el genoma viral lineal. El ADN digerido se purificó mediante extracción con isopropanol y se precipitó durante 16 horas, -20 °C en 300 µl > 95 % de etanol de grado de biología molecular y 10 µl de acetato de sodio 3M. El ADN precipitado se convirtió en pélets mediante centrifugación a 14000 rpm, 5 minutos y se lavó en 500 µl de etanol al 70 %, antes de centrifugar nuevamente, 14000 rpm, 5 minutos. El pélet de ADN limpio se secó al aire y se volvió a suspender en 100 µl de agua. Se mezclaron 6,25 µg de ADN con 15,6 µl de reactivo de transfección de lipofectamina en OptiMEM y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT). La mezcla de transfección se agregó luego a un matraz T-25 que contenía células 293 cultivadas hasta un 80 % de confluencia. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron 4 ml de medios celulares (alta glucosa de DMEM con glutamina complementada con FBS al 10 %) a las células, y los matraces se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Las células Ad293 transfectadas se monitorizaron cada 24 horas y se complementaron con medios adicionales cada 48-72 horas. La producción del virus se

monitoreó mediante observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa celular. Una vez que se observó CPE extenso, el virus se recolectó de células Ad293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Los clones individuales del virus se seleccionaron al diluir en serie el lisado recolectado y al volver a infectar las células Ad293, y al recolectar las cavidades que contenían placas individuales. Las infecciones en serie de las células Ad293 se realizaron una vez que una infección haya alcanzado un CPE completo para amplificar las reservas del virus. La producción viable de virus durante la amplificación se confirmó por observación de CPE significativo en la monocapa celular.

Purificación del virus

Una vez que las reservas de virus potentes se amplificaron, los virus se purificaron mediante doble centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio (bandas) para producir reservas de virus NG-603, NG-604, NG-605 y NG-606. Estas reservas se titularon mediante el ensayo micoBCA (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Tabla 5).

Tabla 5

ID de EnAd	NG ID NO:	SEQ ID del genoma del virus	vp/ml	TCID50/ml
EnAd-CMV-activador bienespecífico de linfocitos T de control	NG-603		$1,42607 \times 10^{12}$	$5,01 \times 10^{10}$
EnAd-SA-activador bienespecífico de linfocitos T de control	NG-604		$3,31073 \times 10^{12}$	$2,00 \times 10^{11}$
EnAd-CMV-activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP	NG-605	SEQ ID NO: 26	$1,64653 \times 10^{12}$	$1,58 \times 10^{11}$
EnAd-SA-activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP	NG-606	SEQ ID NO: 27	$1,28148 \times 10^{12}$	$3,98 \times 10^{10}$
EnAd-CMV- activador bienespecífico de linfocitos T de control-P2A-RFP	NG-607		$5,963 \times 10^{12}$	$1,26 \times 10^9$
EnAd-SA- activador bienespecífico de linfocitos T de control-P2A-RFP	NG-608		$1,51848 \times 10^{12}$	$6,31 \times 10^9$
EnAd-CMV-activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP-P2A-RFP	NG-609		$1,57517 \times 10^{12}$	$7,94 \times 10^9$
EnAd-SA-activador bienespecífico de linfocitos T dirigido a FAP-P2A-RFP	NG-610		$7,74881 \times 10^{11}$	$5,01 \times 10^{10}$

Ejemplo 11

Las actividades de los virus NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605 y NG-606 se caracterizaron mediante los métodos descritos a continuación.

Caracterización de la actividad del EnAd que codifica el activador bienespecífico de linfocitos T en comparación con EnAd en líneas celulares de carcinoma

La capacidad de replicación de NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 o EnAd se analizó mediante la infección de células de carcinoma de pulmón A549 y se evaluó mediante qPCR. Se sembraron células A549 en cavidades de una placa de 24 cavidades a una densidad celular de 2×10^5 células/cavidad. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 partículas por célula (ppc) del virus o se dejaran sin infectar. Las cavidades se recolectaron 24, 48 o 72 horas después de la infección, y el ADN se purificó con el mini kit de ADN genómico PureLink (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los genomas virales totales se cuantificaron mediante qPCR con cada

muestra o estándar extraído con un conjunto de cebador-sonda específico del gen de hexón EnAd en la mezcla de reacción detallada en la Tabla 6. La qPCR se realizó según el programa en la Tabla 7.

Tabla 6

Reactivo	Volumen/cavidad (µl)
2 × mezcla de sondas qPCRBIO (PCRBiosystems)	10
Cebador directo de EnAd	0,08
Cebador inverso de EnAd	0,08
Sonda de EnAd	0,8
NFW	4,04
Muestra	5
Volumen de la cavidad	20

Tabla 7

N.º de Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (segundos)
1	95	120
40	95 60-65	5 20-30

La cuantificación de la cantidad de genomas de virus detectados por célula demostró que la replicación de los virus NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd eran comparables en la línea celular A549 (Figura 22A).

La actividad oncolítica de NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 o EnAd se evaluó mediante la infección de A549 (Figura 22B). Se sembraron células A549 en una placa de 96 cavidades a una densidad celular de $1,5 \times 10^4$ células/cavidad. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con una mayor cantidad de ppc del virus (dilución en serie de 5 veces, $4,1 \times 10^{-7}$ a 5000 de ppc del virus) o se dejaron sin infectar. La citotoxicidad A549 se midió el día 5 mediante el ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS) (Promega, N.º G3582). Las curvas de respuesta a la dosis se ajustaron mediante un modelo de ajuste no lineal de cuatro parámetros integrado en GraphPad Prism. Los valores IC₅₀ generados para cada virus demostraron que las actividades oncolíticas de NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd fueron comparables para cada virus.

Confirmación de la expresión de transgén de activador biespecífico de linfocitos T funcional de NG-603, NG-604, NG-605 y NG-606

Para determinar si los virus NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 produjeron activadores biespecíficos de linfocitos T funcionales, se realizaron ensayos de activación de linfocitos T mediante el uso de líneas celulares CHO, CHO-EpCAM y CHO-FAP como células diana. Se cocultivaron 10.000 células diana con 50.000 linfocitos T CD3⁺ en cavidades de una placa de fondo en forma de U de 96 cavidades con sobrenadantes del virus Ad293 diluido 100 veces en medio de cultivo y se

incubaron durante 24 horas, 37 °C, 5 % de CO₂. Los linfocitos T se recolectaron y se tiñeron con anticuerpos específicos contra CD25 y CD69 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados (Figuras 23A y 23B) indicaron que los virus NG-601 y NG-602 expresaron un transgén de activador biespecífico de linfocitos T funcional que activó los linfocitos T cuando se cocultivaron con las células CHO-EpCAM, y que NG-605 y NG-606 expresaron un transgén de activador biespecífico de linfocitos T funcional que activó los linfocitos T cuando se cocultivaron con las células CHO-FAP, pero no cuando se cocultivaron con las células CHO.

Cuantificación de la expresión de activador biespecífico de linfocitos T en una línea celular de carcinoma de colon

Se evaluó la cantidad de expresión de activador biespecífico de linfocitos T mediante infección con NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 de la línea celular DLD de carcinoma de colon humano. Se sembraron células DLD en placas de cultivo de 6 cavidades a una densidad de $1,2 \times 10^6$ células por cavidad. A las 18 horas posteriores a la siembra, las células DLD se infectaron con EnAd, NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 a 100 ppc. Las células se cultivaron durante 72 horas antes de que los sobrenadantes se recolectaran de las cavidades y se centrifugaran durante 5 minutos a 1200 rpm para eliminar los residuos celulares. Los sobrenadantes clarificados se utilizaron luego para un ensayo de muerte celular, donde se comparó la citotoxicidad con una curva estándar generada con un activador biespecífico de linfocitos T recombinante de concentración conocida, lo que permite determinar la cantidad de activador biespecífico de linfocitos T en sobrenadantes virales.

Para determinar la cantidad de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP producida a partir de NG-605 y NG-606, se realizó un ensayo de citotoxicidad en el que se cocultivaron 8.000 NHDF con 40.000 linfocitos T CD3⁺ y sobrenadantes virales de DLD diluidos 1 en 10³, 1 en 10⁴ y 1 en 10⁵. Se generó una curva estándar al incubar las células NHDF y los linfocitos T CD3⁺ con activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control en diluciones en serie de 10 veces de 3333 a $3,33 \times 10^{-4}$ ng/μl. Los sobrenadantes se recolectaron a las 24 horas posteriores al tratamiento, y la citotoxicidad se midió mediante un ensayo de LDH. La cantidad de activador biespecífico de linfocitos T expresada se determinó al comparar la citotoxicidad de los sobrenadantes virales con la de la curva estándar de activador biespecífico de linfocitos T recombinante. Los resultados (Figura 24) indicaron que los virus NG-605 y NG-606 produjeron 9,8 y 49,2 μg de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP por millón de células DLD,

respectivamente.

Ejemplo 12

Además de codificar un activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control, los virus NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 también tienen un transgén de la proteína fluorescente roja (RFP) para la visualización de las células infectadas mediante métodos de microscopía fluorescente (SEQ ID NO: 20 y 21, Tabla 4). Las actividades funcionales de estos virus se caracterizaron mediante los métodos que se describen a continuación.

Confirmación de la expresión de transgén de NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610

La capacidad de los virus NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610 para producir su transgén de activador biespecífico de linfocitos T se evaluó mediante la infección de las células Ad293. Las células Ad293 se sembraron en una placa de 6 cavidades a 1×10^6 células/cavidad. Las placas se incubaron durante 24 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con virus a 100 ppc o se dejaran sin infectar. A las 48 horas posteriores a la infección, las placas se irradiaron con una lámpara de mercurio fluorescente y se fotografiaron (Figura 18). Los resultados sugirieron que los virus NG-607, NG-608, NG-609 y NG-610 expresan el transgén RFP.

Ejemplo 13

En la siguiente serie de experimentos, se evaluó la capacidad de los virus EnAd y activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 para inactivar las células diana, incluidas las células tumorales y los fibroblastos.

En el primer estudio, la capacidad del EnAd para inactivar las células DLD se evaluó mediante la tecnología xCELLigence. Las células DLD se colocaron en una placa E de 48 cavidades a $1,2 \times 10^4$ células/cavidad y se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 EnAd ppc o se dejaran sin infectar. Se utilizó XCELLigence para medir la citotoxicidad de las células diana cada 15 minutos durante un período de incubación de 8 días.

En un experimento similar, la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para inactivar las células NHDF se evaluó en cocultivo con células tumorales SKOV y linfocitos T CD3⁺ mediante xCELLigence. Las células NHDF y las células SKOV se sembraron en una placa E de 48 cavidades a 4×10^3 y 1×10^3 células/cavidad, respectivamente. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 ppc de EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 o

NG-606 o se dejaron sin infectar. Después de 2 horas de incubación, se agregaron 37.500 linfocitos T CD3⁺ a cada cavidad. Se utilizó xCELLigence para medir la citotoxicidad de las células diana cada 15 minutos. Los resultados (Figura 26A) demuestran que los virus NG-605 y NG-606 que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pero no los virus NG-603 y NG-604 que expresan activador biespecífico de linfocitos T de control o EnAd, fueron capaces de inducir la lisis de las células NHDF, con cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión de activador biespecífico de linfocitos T (más rápido con el promotor de CMV).

En un experimento similar, la capacidad de NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 y EnAd para inactivar las células NHDF se evaluó en cocultivo con células SKOV y linfocitos T CD3⁺ mediante un ensayo de citotoxicidad LDH. Las células NHDF y las células SKOV se sembraron en una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades a 8×10^3 y 2×10^3 células/cavidad, respectivamente, y se infectaron con 100 ppc de EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 o NG-606 o se dejaron sin infectar. Después de 2 horas de incubación, se agregaron 75.000 linfocitos T CD3⁺ a cada cavidad, y las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Los sobrenadantes se recolectaron a las 0, 24, 48 y 96 horas posteriores al tratamiento, y la citotoxicidad se midió mediante un ensayo de citotoxicidad LDH. Los resultados (Figura 26B) demuestran que los virus NG-605 y NG-606 que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pero no los virus NG-603 y NG-604 que expresan activador biespecífico de linfocitos T de control o EnAd, fueron capaces de inducir la lisis de las células NHDF, con cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión de activador biespecífico de linfocitos T.

Como una extensión del experimento LDH anterior, las células también se recolectaron a las 0, 24, 48 y 96 horas posteriores al tratamiento, se tiñeron con anticuerpos contra CD45, CD69 y CD25 y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados (Figura 27) demuestran que los virus NG-605 y NG-606 que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pero no los virus NG-603 y NG-604 que expresan activador biespecífico de linfocitos T de control o EnAd, fueron capaces de inducir la activación de linfocitos T, con cinética dependiente del promotor utilizado para la expresión de activador biespecífico de linfocitos T.

En un experimento similar, se evaluó la dependencia de FAP para inducir la activación de linfocitos T mediada por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP. En una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades, las células SKOV se sembraron a 2×10^3 células/cavidad en soledad o en combinación con células NHDF a 8×10^3 células/cavidad. Las partículas virales se agregaron a cada cavidad a 100 ppc, y

las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de dos horas, se agregaron 75.000 linfocitos T CD3⁺, y las placas se incubaron de manera adicional. A las 96 horas posteriores a la infección, las células se recolectaron y se tiñeron para CD45 y CD25 y se analizaron mediante citometría de flujo (Figura 28A). Los resultados demuestran que los virus NG-605 y NG-606 que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP solo inducían la activación de linfocitos T en presencia de células NHDF positivas para FAP.

En un experimento similar, se investigó de manera adicional la especificidad de la expresión de activador biespecífico de linfocitos T impulsada por el promotor (CMV o virus MLP/SA) en NG-605 y NG-606. En una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades, se sembraron células NHDF a 4x10³ células/cavidad. Se agregaron 100 partículas virales por célula a cada cavidad, y las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de dos horas, se agregaron 40.000 linfocitos CD3 y las placas se incubaron de manera adicional. A las 72 horas posteriores a la infección, se recolectaron los sobrenadantes y se midió la citotoxicidad mediante un ensayo de citotoxicidad LDH. Los resultados (Figura 28B) demuestran que el virus NG-605 impulsado por CMV, pero no el virus NG-606 impulsado por SA, fue capaz de mediar la muerte de las células NHDF tras la infección de las células NHDF solamente.

Los resultados indican que NG-605 y NG-606 fueron capaces de inducir la activación de linfocitos T y la lisis de las células diana, aunque el perfil cinético fue ligeramente diferente según el promotor utilizado.

Se obtuvieron videos de lapso de tiempo para observar la lisis viral o mediada por linfocitos T de células diana mediante activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante, EnAd, NG-603 o NG-605. Las células NHDF se tiñeron con el colorante CellTracker Orange CMTMR (Life Tech, N.º C2927), y los linfocitos T CD3⁺ se tiñeron con el kit de proliferación celular CellTrace Violet (Life Tech, N.º C34557) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las NHDF teñidas se colocaron en una placa de 24 cavidades a 7,5x10³ células/cavidad en cocultivo con 1,35x10⁴ células tumorales SKOV o DLD. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5 % de CO₂. Las células se trataron luego con 300 ng/ml de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o se infectaron con 100 ppc de EnAd, NG-603 y NG-605 o se dejaron sin tratar. Después de dos horas de incubación, se agregaron 100.000 linfocitos T CD3⁺ teñidos a las cavidades necesarias, además de 1,5 µM del reactivo caspasa 3-7 CellEvent (Life Tech, N.º C10423). Los videos se obtuvieron en un microscopio invertido Nikon TE 2000-E Eclipse, con imágenes capturadas cada 15 minutos durante

96 horas. Los cuadros de los videos se muestran en la Figura 29. Los resultados muestran que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante y el NG-605, pero no el EnAd o NG-603, fueron capaces de inducir una lisis rápida de las células NHDF.

En un experimento similar, las células NHDF se tiñeron con el colorante CellTracker Green CMFDA (Life Tech, N.º C2925), y los linfocitos T CD3⁺ se tiñeron con el kit de proliferación celular CellTrace Violet (Life Tech, N.º C34557) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las NHDF teñidas se colocaron en una placa de 24 cavidades a $7,5 \times 10^3$ células/cavidad en cocultivo con $1,35 \times 10^4$ células tumorales SKOV o DLD. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5 % de CO₂. Las células se infectaron luego con 100 ppc de NG-607, NG-608, NG-609 o NG-610 o se dejaron sin infectar. Después de dos horas de incubación, se agregaron 100.000 linfocitos T CD3⁺ teñidos a las cavidades necesarias. Los videos se obtuvieron en un microscopio invertido Nikon TE 2000-E Eclipse, con imágenes capturadas cada 15 minutos durante 96 horas. Los cuadros de los videos se muestran en la Figura 30. Los resultados muestran que todos los virus producen una infección de células tumorales (RFP, fluorescencia roja, positiva), pero solo NG-609 y NG-610 fueron capaces de inducir la lisis rápida de las células NHDF cocultivadas.

Ejemplo 14

En este ejemplo, se evaluó la activación de linfocitos autólogos asociados a tumores de ascitis maligna primaria FAP⁺ de pacientes con cáncer por EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 y NG-606. Las muestras de pacientes consideradas adecuadas para el análisis adicional fueron las que contenían linfocitos T CD3⁺ y células FAP⁺.

En el primer experimento, se sembraron células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde el momento en que se recibieron) de un paciente a 250,000 células por cavidad de una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades en fluido de ascitis al 100%. Las células se infectaron con virus a 100 ppc, y las cavidades sin tratar sirvieron como controles negativos. EnAd-CMV-GFP y EnAd-SA-GFP también se incluyeron en el experimento como un indicador para determinar la infección y la expresión génica viral en etapa tardía, respectivamente, con micrografías. Después de la incubación a 37 °C durante 5 días, se recolectó la población celular total y se determinó el nivel de expresión de CD25 en los linfocitos T CD3⁺ (Figura 32A). La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de microesferas de recuento de precisión. Los resultados demuestran que los virus activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP NG-605 y NG-606 dieron como resultado aumentos

significativos en la activación de linfocitos T de linfocitos asociados a tumores.

Como una extensión del experimento anterior, se recolectaron cavidades de replicación y se determinó la cantidad de células FAP⁺ endógenas mediante citometría de flujo. La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de microesferas de recuento de precisión. Los resultados (Figura 40B) muestran que NG-605 y NG-606 dieron como resultado una disminución significativa en la cantidad de células autólogas que expresan FAP en las muestras de ascitis, lo que sugiere que los linfocitos T activados habían inactivado algunas células FAP⁺.

En un segundo experimento, se sembraron células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde el momento en que se recibieron) de un paciente con cáncer a 250.000 células por cavidad de una placa con fondo en forma de U de 96 cavidades en ya sea fluido de ascitis al 100% o medio complementado con suero humano al 1 %. Las células se infectaron con virus a 100 ppc, y las cavidades sin tratar sirvieron como controles negativos. EnAd-CMV-GFP y EnAd-SA-GFP también se incluyeron como un indicador para determinar la infección y la expresión génica viral en etapa tardía, respectivamente, con micrografías. Después de la incubación a 37 °C durante 5 días, se recolectó la población celular total y se determinaron la cantidad de linfocitos T CD3⁺ (Figura 33) y el nivel de expresión de CD25 en los linfocitos T CD3⁺ (Figura 34). La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de microesferas de recuento de precisión. Los resultados demuestran que, para este paciente, activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante y NG-605, pero no NG-606, dieron como resultado un aumento significativo en la activación de linfocitos T de linfocitos asociados a tumores en los medios. Ninguno de los dos virus produjo la activación en el fluido de ascitis.

Como una extensión del experimento anterior, se recolectaron cavidades de replicación y se determinó la cantidad de células FAP⁺ mediante citometría de flujo (Figura 35). La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de microesferas de recuento de precisión. Los resultados demuestran que activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinante y NG-605, pero no NG-606, dieron como resultado una disminución significativa en la cantidad de células autólogas que expresan FAP en los medios. Ninguno de los dos virus produjo una reducción de células FAP⁺ en el fluido de ascitis.

Ejemplo 15 - Análisis

Los virus oncolíticos ofrecen una nueva estrategia intrigante para combinar varias modalidades terapéuticas dentro de un único agente diana autoamplificante

(Keller & Bell, 2016; Seymour & Fisher, 2016). A medida que se replican de manera selectiva dentro de las células cancerosas y se propagan de una célula a otra, se piensa que algunos virus oncolíticos median la muerte celular por vías de muerte no apoptótica (Ingemarsdotter et al, 2010; Li et al, 2013), como parte del proceso que permite que las partículas virales escapen de las células moribundas. En particular, el EnAd inactiva las células mediante un proceso proinflamatorio conocido como oncosis o muerte celular isquémica (Dyer, 2017). Este mecanismo de muerte no apoptótica provoca la liberación de varios componentes celulares proinflamatorios, tales como ATP, HMGB1 y la exposición a la calreticulina (conocida como patrones moleculares asociados al daño, DAMPs) (Weerasinghe & Buja, 2012), y es probablemente fundamental para la capacidad del virus para promover una respuesta inmunitaria antineoplásica eficaz. Sin embargo, además de las consecuencias de la lisis directa, los virus ofrecen el potencial de codificar y expresar otros compuestos biológicos antineoplásicos, lo que evita problemas de administración y asegura que el compuesto biológico alcance su concentración más alta dentro del microentorno tumoral. Imlytic codifica GM-CSF; sin embargo, el potencial para armar virus es prácticamente ilimitado y proporciona muchas oportunidades interesantes para diseñar estrategias terapéuticas multimodales con efectos antineoplásicos aditivos o sinérgicos (de Gruijl et al, 2015; Hermiston & Kuhn, 2002).

La codificación de activador inespecífico de linfocitos T dentro de los virus oncolíticos proporciona un medio poderoso para activar los linfocitos infiltrantes de tumores para que se vuelvan citotóxicos y lisen células diana positivas para el antígeno, lo que proporciona una modalidad terapéutica completamente separada de los efectos de la lisis viral directa. En este estudio se ha demostrado que la citotoxicidad dirigida a activador inespecífico de linfocitos T es completamente específica del antígeno, puede ser mediada por linfocitos T tanto CD4 como CD8 (Brischwein et al, 2006) y puede incorporarse a un adenovirus oncolítico y expresarse solo en células que permiten la replicación del virus. Además, el estudio actual muestra, por primera vez, que los linfocitos T endógenos dentro de las biopsias de cáncer líquido pueden ser activados por activadores inespecíficos de linfocitos T y activadores inespecíficos de linfocitos T codificados por virus y pueden inactivar células tumorales endógenas sin estimulación adicional alguna o inversión de la supresión inmunitaria. Es importante destacar que esto puede ocurrir incluso en los fluidos primarios que comprenden el microentorno de la ascitis peritoneal o los derrames pleurales, como sustitutos del microentorno inmunosupresor de los tumores

sólidos.

Armar los virus oncolíticos para expresar activadores biespecíficos de linfocitos T combina dos mecanismos terapéuticos bastante distintos, en donde el primero proporciona la muerte lítica de las células tumorales que son permisivas para la infección viral y el último se dirige a la citotoxicidad de linfocitos T a través de un antígeno específico elegido. Esto proporciona una flexibilidad considerable en el diseño de un enfoque terapéutico, tal vez con el uso de los activadores biespecíficos de linfocitos T para administrar citotoxicidad a las células asociadas a tumores que son relativamente resistentes a la muerte por parte del virus de manera directa. Por ejemplo, aunque se ha ejemplificado la tecnología en la presente con el uso de un activador biespecífico de linfocitos T que reconoce un antígeno asociado a carcinoma (EpCAM), también es posible utilizar el enfoque de activador biespecífico de linfocitos T para dirigir la citotoxicidad a fibroblastos asociados a tumores u otras células estromales. De hecho, incluso cuando las dianas para el reconocimiento de activador biespecífico de linfocitos T no están restringidas a la expresión en el microentorno tumoral, al ligar la producción de activador biespecífico de linfocitos T con la replicación del virus, la expresión del activador biespecífico de linfocitos T se restringe espacialmente al tumor, lo que minimiza las toxicidades sistémicas. Esto es importante, ya que los activadores biespecíficos de linfocitos T administrados por vía intravenosa muestran una cinética de circulación relativamente corta (Klinger et al, 2012) y, a menudo, se asocian con considerables toxicidades fuera del tumor dentro de la diana (Teachey et al, 2013).

La posibilidad de codificar activadores biespecíficos de linfocitos T dentro de virus oncolíticos se ha explorado previamente mediante un virus vaccinia oncolítico con un activador biespecífico de linfocitos T dirigido a la efrina A2. Este agente mostró que el activador biespecífico de linfocitos T de efrina podría mediar la activación de PBMC y la muerte de células tumorales dirigida a antígenos tanto *in vitro* como *in vivo*. Curiosamente, aunque el activador biespecífico de linfocitos T pudo activar los linfocitos T, no produjo la proliferación de linfocitos T sin la adición de IL-2 exógena, mientras que el activador biespecífico de linfocitos T utilizado en el estudio actual produjo una proliferación extensa tanto de PBMC *in vitro* como de linfocitos asociados a tumores mediante el uso de las muestras de biopsia clínica *ex vivo*.

Se cree que las diferencias observadas pueden reflejar el diseño diferente de activador biespecífico de linfocitos T, el virus oncolítico diferente utilizado o quizás depender de la densidad del antígeno que proporciona suficiente reticulación de CD3

en los linfocitos T.

Un objetivo central de la terapia con virus oncolítico es crear una respuesta antineoplásica de linfocitos T que reconozca a los neoantígenos específicos de pacientes, así como a los antígenos asociados a tumores "públicos". Los virus líticos pueden hacer esto al estimular la presentación mejorada de antígenos mediante la lisis de células tumorales en el contexto de los DAMP junto con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) relacionados con el virus. La tinción inmunohistoquímica de tumores de colon extirpados tras la administración intravenosa de EnAd sugiere que el virus promueve un fuerte ingreso de linfocitos T CD8+ en el tejido tumoral (Garcia-Carbonero, 2017). Sin embargo, aunque este es potencialmente un enfoque muy poderoso, las respuestas adaptativas de los linfocitos T dependen en última instancia de la expresión de los antígenos de clase I de MHC por parte de las células tumorales para permitir la muerte selectiva. La pérdida de la expresión de MHC es una estrategia de evasión inmunitaria bien documentada para tumores (Garrido et al, 2016).

Cabe destacar que ambas estrategias citotóxicas que se acoplan de inmediato con los virus oncolíticos armados con activador biespecífico de linfocitos T funcionan de manera independiente a la clase I de MHC por parte de las células tumorales y, por lo tanto, pueden emplearse para inactivar células cancerosas incluso cuando las células tumorales han perdido la expresión de MHC.

Por lo tanto, el presente estudio demuestra que la codificación de activadores biespecíficos de linfocitos T dentro de EnAd proporciona una estrategia particularmente prometedora para lograr la expresión dirigida en tumores diseminados, lo que aprovecha la estabilidad en sangre y la biodisponibilidad sistémica conocidas del virus, que se ha estudiado en la actualidad en varios ensayos clínicos en fase temprana. En particular, en un estudio donde el virus se administra por vía intravenosa unos días antes de la resección del cáncer de colon primario, la evaluación inmunohistológica posterior de las secciones tumorales mostró que el virus había alcanzado las regiones a través de los tumores y proporcionó marcadas señales del hexón intranuclear, lo que indica una infección exitosa y la replicación del virus selectivamente en células tumorales. Esto confirma los datos preclínicos (Di et al, 2014; Illingworth, 2017) que indican que este virus es estable en el 100 % de la sangre humana y debería ser capaz de una infección dirigida a tumores de neoplasias diseminadas y metastásicas en pacientes humanos.

Los activadores biespecíficos de linfocitos T podrían ser codificados por el

EnAd sin pérdida alguna de virulencia oncolítica, lo que refleja la considerable capacidad de empaquetamiento del transgén del virus. La presencia del transgén no afectará las propiedades fisicoquímicas de las partículas virales; por lo tanto, los virus modificados deberían exhibir exactamente la misma farmacocinética clínica que el agente parental y deberían ser capaces de expresar el activador biespecífico de linfocitos T codificado selectivamente dentro de los tumores en todo el cuerpo. Esto proporciona un enfoque nuevo interesante y potencialmente muy eficaz para la inmunoterapia contra el cáncer dirigida de manera sistémica que en la actualidad debe priorizarse para la evaluación clínica.

Ejemplo 16

Inmunosupresión de la activación de linfocitos T humanos y la citotoxicidad de células diana por los fluidos exudados malignos de pacientes

Los exudados malignos representan un entorno de tolerancia inmunitaria potencial con respuestas inmunitarias suprimidas que se observan con frecuencia en pacientes con cáncer metastásico en estadio tardío. La cantidad de IL-10, considerada como una citocina antiinflamatoria, se midió en el suero normal o fluidos exudados malignos del paciente (A, ascitis peritoneal; P, derrame pleural) mediante el uso del kit MAX ELISA de IL-10 humana (Biolegend, 430604). Los niveles de IL-10 en los exudados (88,1 – 633,4 pg/mL) estaban más excedidos que los medidos en suero normal (7,2 – 10 pg/ml).

Se investigó la capacidad de las microesferas CD3/CD28 (Gibco, 11161D) para activar linfocitos T de PBMC en presencia de suero normal, ascitis o fluido pleural. Los linfocitos T humanos de PBMC (100.000 células por cavidad en una placa de 96 cavidades) se trataron con microesferas CD3/CD28 (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) en suero normal o fluido exudado del paciente (50 %). Los linfocitos T se dejaron sin tratar en cada fluido como control negativo. Después de 24 horas de cultivo, las células se recolectaron, y los niveles de expresión de CD69 y CD25 en los linfocitos T CD3+ se analizaron luego mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo representadas como porcentaje de doble positivo (células CD69+CD25+). En suero normal, las microesferas anti-CD3/CD28 proporcionaron alrededor del 60 % de linfocitos T dobles positivos tanto para CD25 como para CD69, mientras que la presencia del fluido de ascitis atenuó la activación de linfocitos T en 6/12 fluidos.

En un experimento similar, se trataron 100.000 linfocitos T con microesferas CD3/CD28 en presencia de suero normal, ascitis o fluido pleural (50 %). Los anticuerpos de control de isotipo o anti-CD107a se agregaron directamente al medio

de cultivo. Después de 1 hora, se agregó monensina (BD Golgistop, BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 5 horas más, las células se recolectaron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la desgranulación. En suero normal, las microesferas anti-CD3/CD28 proporcionaron alrededor del 22,5 % de linfocitos T desgranulados, mientras que la presencia del fluido de ascitis atenuó la activación de linfocitos T en 10/12 fluidos. El nivel de desgranulación fue significativamente correlativo (coeficiente de Pearson, $r = -0,7645$; $p = 0,0038$) con la cantidad de IL-10 en cada fluido.

En un experimento similar, 75.000 linfocitos T se cocultivaron con 15.000 SKOV3 y EpCAM en presencia de suero normal, ascitis o fluido pleural (50 %). Los linfocitos T se trataron con activador biespecífico de linfocitos T de control en cada fluido como control negativo. Después de 24 horas de cultivo, las células se recolectaron, y los niveles de expresión de CD69 y CD25 en los linfocitos T CD3+ se analizaron luego mediante tinción de anticuerpos y citometría de flujo representadas como porcentaje de doble positivo (células CD69+CD25+). En suero normal, el activador biespecífico de linfocitos T EpCAM proporcionó alrededor del 67,6% de linfocitos T dobles positivos tanto para CD25 como para CD69, mientras que la presencia del fluido de ascitis atenuó la activación de linfocitos T en 0/12 fluidos e indujo ligeramente la activación en 4/10 fluidos.

En un experimento similar, 75.000 linfocitos T se cocultivaron con 15.000 SKOV3 y EpCAM en presencia de suero normal, ascitis o fluido pleural (50 %). Los linfocitos T se trataron con activador biespecífico de linfocitos T de control en cada fluido como control negativo. Los anticuerpos de control de isotipo o anti-CD107a se agregaron directamente al medio de cultivo. Después de 1 hora, se agregó monensina (BD Golgistop, BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 5 horas más, las células se recolectaron y analizaron mediante citometría de flujo para determinar la desgranulación. En suero normal, las microesferas activador biespecífico de linfocitos T EpCAM proporcionaron alrededor del 41,4 % de linfocitos T desgranulados, mientras que la presencia del fluido de ascitis atenuó la activación de linfocitos T en 2/12 fluidos.

La capacidad de Enad-SA-activador biespecífico de linfocitos T EpCAM y Enad-SA-activador biespecífico de linfocitos T de control para inducir la lisis de células diana mediada por linfocitos T en fluidos exudados malignos se evaluó mediante la tecnología xCELLigence. Las células SKOV se colocaron en una placa E de 48 cavidades a 1×10^4 células/cavidad. Las placas se incubaron durante 18 horas, 37 °C, 5

% de CO₂, antes de que las células se infectaran con 100 partículas por célula (ppc) del virus o se dejaran sin infectar. Después de dos horas, se agregaron linfocitos T de PBMC (5:1) en suero normal o fluido exudado del paciente (final, 50 %). Se utilizó xCELLigence para medir la citotoxicidad de las células diana cada 10 minutos. Los resultados sugieren que la lisis de SKOV3 mediada por activador biespecífico de linfocitos T por parte de los linfocitos T es independiente del fluido utilizado.

Las células de ascitis no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde el momento en que se recibieron) se siembran a 100.000 células por cavidad de una placa de fondo plano de 96 cavidades en medios RPMI o fluido de ascitis. Las células se trataron con activador biespecífico de linfocitos T EpCAM o activador biespecífico de linfocitos T de control, y las cavidades sin tratar sirvieron como un control negativo. Después de la incubación a 37 °C durante 24 horas, se recolectaron las células y se determinó el nivel de expresión de CD25 y CD69 en linfocitos CD3. Los resultados demuestran que el activador biespecífico de linfocitos T EpCAM produjo un aumento significativo en la activación de linfocitos T (CD69/CD25 doble positivo) de linfocitos asociados a tumores, ligeramente aumentada por el fluido de ascitis.

En un experimento similar, las células de ascitis sin purificar no purificadas (por lo tanto, sin cambios desde el momento en que se recibieron) se siembran a 100.000 células por cavidad de una placa de fondo plano de 96 cavidades en medios RPMI o fluido de ascitis. Las células se trataron con virus EpCAM, activador biespecífico de linfocitos T de control o activador biespecífico de linfocitos T recombinante (100 vp/célula), y las cavidades sin tratar sirvieron como un control negativo. Después de la incubación a 37°C durante 5 días, se recolectó la población celular total, y se determinaron la cantidad de linfocitos CD3+, el nivel de expresión de CD25 en linfocitos CD3 y la cantidad de células EpCaM+ endógenas mediante citometría de flujo. La cantidad total de células por cavidad se determinó mediante el uso de microesferas de recuento de precisión. Los resultados demuestran que el activador biespecífico de linfocitos T EpCAM y el EnAd que expresa el activador biespecífico de linfocitos T EpCAM dieron como resultado un aumento significativo en la activación de linfocitos T (cantidad de CD3, CD25) de linfocitos asociados a tumores y citotoxicidad de células EpCAM+ en medios RPMI y fluido de ascitis.

Como una extensión del experimento anterior, se trataron de manera idéntica seis muestras más de exudados de pacientes (para un total de 7) en fluido de ascitis, y se determinaron la cantidad de CD3+, la expresión de CD25 de linfocitos T y la cantidad de células EpCAM+ mediante citometría de flujo. Los resultados muestran

que el activador biespecífico de linfocitos T EpCAM y el EnAd que expresa el activador biespecífico de linfocitos T EpCAM dieron como resultado un aumento significativo en la activación de linfocitos T (cantidad de CD3, CD25) de linfocitos asociados a tumores y citotoxicidad de células EpCAM⁺ de manera reproducible en una variedad de muestras de biopsias de exudados.

Ejemplo 17

El activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP media la activación de los linfocitos T y la muerte de las células FAP⁺ por diferentes linfocitos T donantes

En otros experimentos, los métodos descritos en el Ejemplo 2 se usaron para evaluar de manera adicional las propiedades de activación de linfocitos T de la proteína de activador biespecífico de linfocitos T dirigida a FAP recombinante evaluadas en cocultivos de NHDF y linfocitos T, en comparación con el activador biespecífico de linfocitos T de control y la activación de linfocitos T policlonales mediante Dynabeads anti-CD3/CD28.

Los sobrenadantes tomados después de 24 horas de cultivo se evaluaron mediante ELISA para IFN γ (Figura 36A) y mediante matriz de microesferas de citocinas (panel de citocinas de linfocitos T colaboradores humanos LEGENDplex, BioLegend N.º 74001) para un panel de citocinas (Figura 36B). El activador biespecífico de linfocitos T de control no indujo cambio significativo alguno en ninguna citocina; sin embargo, el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP produjo marcados aumentos en el interferón gamma, IL-2, TNF α , IL-17 e IL-10, lo que es consistente con los diferentes subconjuntos de linfocitos T que se estimulan, y la producción de IFN γ fue mucho mayor que la activada por anti-CD3/CD28.

La estimulación con el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, pero no con el activador biespecífico de linfocitos T de control, en presencia de células NHDF también indujo una rápida desgranulación (dentro de las 6 horas) de linfocitos T, tanto de subconjuntos CD4⁺ como de CD8⁺, según lo determinado por la externalización de CD107a/LAMP1 en la superficie de los linfocitos T (según lo evaluado mediante citometría de flujo), lo que se correlaciona de manera marcada con su capacidad para inactivar células diana (Figura 36A&B). Esta inducción de la desgranulación por parte del activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP se tradujo en una potente lisis de fibroblastos (Figura 69C), según lo medido por la liberación de LDH después de 24 horas de cocultivo con linfocitos T de PBMC (EC₅₀ de ~2,5 ng/ml) con activación inducida de linfocitos T y citotoxicidad observada mediante 6/6 linfocitos T donantes (Figura 69D). El activador biespecífico de linfocitos

T de control no indujo citotoxicidad, lo que es consistente con el hecho de que los linfocitos T permanecieron en un estado inactivado.

Ejemplo 18

Efecto de los virus de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y EnAd-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP en células en muestras de ascitis maligna primaria de diferentes pacientes con cáncer

Como una continuación de los estudios descritos en el Ejemplo 16, se obtuvieron muestras frescas de ascitis peritoneal maligna primaria de otros pacientes con cáncer para estudiar las actividades del virus activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP EnAd . Tres muestras de pacientes que contenían tanto células tumorales EpCAM⁺ como fibroblastos FAP⁺ se expandieron *ex vivo*, y las poblaciones celulares (adherentes) mixtas se cultivaron con linfocitos T derivados de PBMC y virus EnAd no modificados o que expresan activador biespecífico de linfocitos T. Después de 72 horas, se recolectaron las células totales y se determinó la cantidad de células FAP⁺ (Figura 38A) y EpCAM⁺ (Figura 38B) mediante citometría de flujo. Además, se midió el estado de activación de linfocitos T (por expresión de CD25) (Figura 38C). La infección con EnAd-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP indujo la activación de linfocitos T y la disminución de las células FAP⁺ en todas las muestras de pacientes, sin un cambio significativo en los niveles de las células tumorales EpCAM⁺. El EnAd parental o los virus de control no indujeron una activación observable de linfocitos T, con cantidades de células FAP⁺ similares al control no infectado.

Es importante destacar que esta disminución de los fibroblastos FAP⁺ produjo consistentemente una reducción marcada en los niveles de la citocina inmunosupresora TGF β detectados en los sobrenadantes (Figura 38D).

En una segunda serie de experimentos, se analizaron células totales (y no purificadas) de cinco muestras de biopsias de pacientes para evaluar la actividad de linfocitos T asociados a tumores endógenos en las muestras. Las células se colocaron en placas en un fluido de ascitis al 50% y se trataron con proteínas de control recombinante o activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, o 100 vp/célula de los virus EnAd o EnAd-activador biespecífico de linfocitos T. Después de 5 días de incubación, la activación de linfocitos T (por expresión de CD25) y la cantidad residual de células FAP⁺ se midieron mediante citometría de flujo (Figura 39A&B). En las 3 muestras de pacientes, activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAPy EnAd-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP recombinantes indujeron una

marcada activación de linfocitos T, con hasta ~80 % de linfocitos T derivados de pacientes activados, lo que causó una notable disminución de fibroblastos FAP⁺. Curiosamente, EnAd-SA-FAP-activador biespecífico de linfocitos T indujo la expresión de CD25 en 2/3 muestras, sin activación o disminución de células FAP⁺ observables en el paciente 1. Probablemente esto se deba a una cantidad insuficiente de células tumorales presente para la infección por el virus y la producción de la proteína de activador biespecífico de linfocitos T (no se detectaron células tumorales EpCAM⁺ en esta muestra mediante citometría de flujo), lo que es consistente con el requisito de las células tumorales para la expresión de transgén impulsada por MLP (SA) (esto probablemente también explica la falta de activación de linfocitos T y la disminución de células FAP⁺ por el parte del virus EnAd-SA- activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP con la muestra de ascitis del paciente ilustrada en las Figuras 42-44). En conjunto, los datos muestran que el EnAd que expresa el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP- puede, tras la infección de las células tumorales, producir de manera reproducible la activación de linfocitos T asociados a tumores para inactivar los fibroblastos endógenos.

Otro experimento investigó si la actividad de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP podría mejorarse al bloquear el punto de control de PD-1, mediante el uso de una muestra de biopsia del paciente en la que los linfocitos T eran 73,6 % positivos para PD-1 y las células FAP⁺ eran 62,9 % positivas para PDL1 (Figura 40A). Los cocultivos similares a los descritos anteriormente se establecieron en presencia o ausencia de un anticuerpo IgG2b de ratón de bloqueo purificado para PDL1 humano (BioLegend, clon 29E.2A3) a una concentración final de 2,5 µg/ml. Después de 2 días de cultivo, se recolectaron las células totales y se midieron las células FAP⁺ residuales y la activación de linfocitos T. La inclusión del anticuerpo anti-PDL1 de bloqueo produjo un aumento moderado en la inducción de CD25 (Figura 40B) y una producción de IFN γ dos veces mayor (Figura 40C), sin alterar la disminución de las células FAP⁺ (Figura 40D) con una lisis casi completa al día 2 en cualquiera de los casos.

Se ha informado que los linfocitos asociados a tumores (TAL) aislados de ascitis de pacientes con cáncer de ovario tienen una expresión enriquecida de PD-1 y funciones efectoras alteradas, incluidas la citotoxicidad y la producción de IFN γ . De acuerdo con esto, la expresión de PD-1 fue 2 veces mayor en los linfocitos CD3⁺ de seis biopsias de ascitis de pacientes con cáncer que en aquellas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de tres donantes sanos (Figura 41A). Para evaluar la funcionalidad de los linfocitos T dentro de estas muestras de biopsia

de cáncer, las células NHDF y las células PBMC o de ascitis no purificadas (el % de linfocitos CD3+ para cada una de las muestras se muestra en la Figura 41B) se cocultivaron con sobrenadantes que contenían activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control, y los sobrenadantes se recolectaron 5 días más tarde y se analizaron para detectar IFN γ mediante ELISA (Figura 41C). El activador biespecífico de linfocitos T de control no indujo IFN γ . Tres de las muestras de células de ascitis produjeron IFN γ a un nivel similar al de las muestras de PBMC, mientras que las otras tres tuvieron una respuesta atenuada al activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP. A continuación, se investigó la capacidad de estos linfocitos T para inducir la lisis mediada por activador biespecífico de linfocitos T de las células NHDF. Las NHDF se colocaron en placas, se agregaron células PBMC o de ascitis junto con sobrenadantes que contenían activador biespecífico de linfocitos T, y la viabilidad de las células en el cultivo se monitoreó en tiempo real mediante el sistema de ensayo de citotoxicidad xCELLigence. A pesar de la variabilidad en la producción de IFN γ , todas las muestras de ascitis indujeron la citotoxicidad completa de las células NHDF cuando se agregaron con el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, con una tasa de lisis de NHDF mediada por activador biespecífico de linfocitos T similar en términos generales a la observada cuando se realiza por PBMC (Figura 41D).

Para investigar si el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP puede mediar la activación de linfocitos T en presencia de muestras de exudado maligno de pacientes (todas al 50 %), los linfocitos T de PBMC se activaron con activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control en presencia de células NHDF o se activaron con Dynabeads anti-CD3/CD28, ya sea en suero humano normal (NS) al 50 % o en diferentes muestras de exudado maligno (libre de células). Mientras que, en el suero normal, el 74 % de los linfocitos T se activaron (doble positivo tanto para CD25 como CD69) a las 24 horas tras la estimulación con las microesferas anti-CD3/CD28, 3/5 fluidos de ascitis evaluados atenuaron significativamente la activación de linfocitos T en comparación con la respuesta en NS (Figura 42A). Sin embargo, cuando las PBMC se cultivaron con NHDF y se estimularon con el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP, no se observó supresión alguna de la activación de linfocitos T en presencia de ninguno de los fluidos exudados (Figura 42B), lo que demuestra que el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP puede superar los mecanismos inmunosupresores para activar linfocitos T.

Ejemplo 19

La oncolisis mediada por EnAd-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAPy la estimulación de linfocitos T polarizan los TAM CD11b en pacientes con ascitis a un fenotipo más activado

Para investigar si la producción de citocinas Th1, incluidas IFN γ , TNF α e IL-2, mediante la activación de linfocitos T mediada por activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y la posterior eliminación de fibroblastos FAP⁺ (y la reducción asociada de TGF β 1 se asoció con otros desplazamientos en el microentorno tumoral de la actividad inmunosupresora y pro-oncogénica hacia antitumoral, se evaluó el efecto sobre los macrófagos asociados a tumores (TAM) en una muestra de células de ascitis no separadas. Las células de ascitis de pacientes no purificadas totales se colocaron en placas en fluido de ascitis al 50 % y se trataron con activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o activador biespecífico de linfocitos T de control libre o se infectaron con el virus EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T de control o EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (a 100 vp/célula). En paralelo, algunas células se trataron con IFN γ para inducir un fenotipo de células mieloides CD11b activadas. Después de 3 días de incubación, se midió primero el estado de activación de linfocitos T; las células CD25⁺ se midieron mediante citometría de flujo y la secreción de IFN γ mediante ELISA.

El tratamiento con activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP produjo que alrededor del 60 % de los linfocitos T CD3⁺ se convirtieran en CD25⁺ (Figura 43A) y grandes cantidades de IFN γ en sobrenadantes de cultivo (Figura 43B). No se observó aumento alguno por encima del fondo por el activador biespecífico de linfocitos T de control o el virus de control para la expresión de CD25 o IFN γ . Para evaluar la polarización TAM, los niveles de expresión de CD64 y CD86 (M1 o marcadores de macrófagos 'activados') y CD206 y CD163 (marcadores M2 o TAM) se midieron en células CD11b⁺ mediante citometría de flujo (Figura 43C). El tratamiento con el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP libre o el EnAd que expresa el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP induce un fenotipo más activado, que se manifiesta por aumentos significativos en la expresión de CD64 y una fuerte disminución de CD206 y CD163, similar a lo observado cuando se agregó IFN γ en los cultivos.

Si bien el tratamiento con el activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP libre o el virus de control no indujo un cambio claro en CD86 por encima del fondo en este experimento, el EnAd que expresa el activador biespecífico de linfocitos T dirigido

a FAP indujo un gran aumento en la expresión de CD86, lo que indica que la infección por el virus EnAd y la actividad de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP pueden sinergizarse para activar células mieloides primarias dentro de un microentorno tumoral supresor, tal como las muestras de fluido de ascitis maligna analizadas en la presente. En este estudio, el tratamiento con IFN γ indujo una disminución moderada en CD86, lo que indica que el aumento marcado en CD86 observado por EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP puede ser a través de un mecanismo independiente de IFN γ .

Ejemplo 20

EnAd-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP activa los linfocitos infiltrantes de tumores e induce la citotoxicidad en biopsias de tumores de próstata sólidos ex vivo

Los cultivos de rebanadas de tejido proporcionan uno de los modelos preclínicos más realistas de diversos tejidos, órganos y tumores. Para evaluar la actividad de los virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP en este entorno altamente relevante desde el punto de vista clínico, se estudiaron varias biopsias de perforación apareadas de tejido prostático benigno y maligno de próstatas humanas extirpadas. En el cribado inicial, se mostró de manera reproducible que el tejido prostático tenía anillos circulares de células tumorales EpCAM+ (Figura 44A) intercaladas entre grandes regiones de estroma que contenían linfocitos T CD8 dispersos (Figura 44B). Se encontró tinción con FAP en fibroblastos adyacentes a las regiones tumorales (Figura 44C).

Los núcleos se rebanaron en un vibrátomo de 300 μ m de espesor, y los cultivos de rebanadas se establecieron en presencia del virus (1.5e9 vp/rebanada) o se dejaron sin infectar. Después de 7 días, las rebanadas se fijaron, se embebieron en parafina y se seccionaron, y el estado de activación de linfocitos T se evaluó a través de la inmunohistoquímica (IHC) mediante tinción para la expresión de CD25 (Figura 44D). Solo las muestras que recibieron EnAd-CMV-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP o EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP mostraron activación de linfocitos T infiltrantes de tumores, que se manifiesta por una marcada tinción con CD25. Ni la condición sin tratar ni la tratada con virus de control tenían células positivas para CD25 detectables. Los sobrenadantes de estos cultivos de rebanadas tomados a los 4 y 7 días tras la infección se analizaron para detectar IFN γ e IL-2 mediante ELISA, con aumentos de IFN γ detectados en cultivos de rebanadas de próstata malignos, pero no benignos, infectados con cualquiera de los

virus de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (Figura 44E) e IL-2 detectados en cultivos con el virus EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP (Figura 44F). EnAd-SA-activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP indujo mayores cantidades de IFN γ , que eran detectables anteriormente, que el virus de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP impulsado por CMV.

Ejemplo 21 - Virus EnAd adicionales que expresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP

Se generaron cinco virus (NG-611, NG-612, NG-613, NG-614, NG-617) que codifican un único activador biespecífico de linfocitos T (Tabla 8).

Tabla 8

ID del virus	Casete de transgén
NG-612 (SEQ ID NO: 78)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ⁵ -His ³ -PA ⁴
NG-613 (SEQ ID NO: 79)	SA ⁶ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ⁵ -His ³ -PA ⁴
NG-614 (SEQ ID NO: 73)	SA ⁶ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ⁷ -His ³ -PA ⁴
NG-617 (SEQ ID NO: 81)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ⁵ -PA ⁴

En cada casete de transgén, el cADN que codifica el activador biespecífico de linfocitos T estaba flanqueado en el extremo 5' con una secuencia aceptora de empalme corto (SSA, CAGG) o una secuencia aceptora de empalme más largo (SA, SEQUENCE ID NO: 45). En el extremo 3' del activador biespecífico de linfocitos T, se codificó una secuencia de poli(A) tardía de SV40 (PA, SEQ ID NO: 54) precedida por una etiqueta de histidina (HIS) o ninguna etiqueta. En los virus NG-611, NG-612, NG-613 y NG-617, la porción anti-CD3 de la molécula de activador biespecífico de linfocitos T utilizó una variante monocatenaria del anticuerpo monoclonal anti-CD3 ϵ humano de ratón OKT3.

Producción del virus

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los plásmidos pNG-611, pNG-612, pNG-613, pNG-614 y pNG-617 mediante la inserción directa de casetes de transgén sintetizados (SEQ ID NO: 70-74, respectivamente). Los casetes de transgén pNG-612, pNG-613 y pNG-617 codifican un activador biespecífico de linfocitos T que se dirige a FAP de la SEQ ID NO. 75, y el casete de transgén pNG-614 codifica un activador biespecífico de linfocitos T que se dirige a FAP de la SEQ ID NO. 76. Los esquemas de los casetes de transgén se muestran en las Figuras 45A a C. La construcción del

ADN de plásmido se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación del ADN.

Los plásmidos, pNG-611, pNG-612, pNG-613, pNG-614 y pNG-617, se alinearon mediante digestión de restricción con la enzima *Ascl* para producir los genomas virales. Los virus se amplificaron y se purificaron de acuerdo con los métodos proporcionados a continuación.

El ADN digerido se purificó mediante extracción con fenol/cloroformo y se precipitó durante 16 horas, -20 °C en 300 µl > 95 % de etanol de grado de biología molecular y 10 µl de acetato de sodio 3M. El ADN precipitado se convirtió en pélets mediante centrifugación a 14000 rpm, 5 minutos y se lavó en 500 µl de etanol al 70 %, antes de centrifugar nuevamente, 14000 rpm, 5 minutos. Los pélets de ADN limpio se secaron al aire, se volvieron a suspender en 500 µl de OptiMEM que contenía 15 µl de reactivo de transfección de lipofectamina y se incubaron durante 30 minutos, temperatura ambiente. La mezcla de transfección se agregó luego por goteo a un matraz T-25 que contenía células 293 cultivadas hasta un 70 % de confluencia. Después de la incubación de las células con la mezcla de transfección durante 2 horas a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron 4 ml de medios celulares (alta glucosa de DMEM con glutamina complementada con FBS al 2 %) a las células, y los matraces se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂.

Las células 293 transfectadas se monitorearon cada 24 horas y se complementaron con medios adicionales cada 48-72 horas. La producción del virus se monitoreó mediante observación de un efecto citopático significativo (CPE) en la monocapa celular. Una vez que se observó CPE extenso, el virus se recolectó de células 293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Los virus recolectados se usaron para volver a infectar células 293 con el fin de amplificar las reservas de virus. La producción viable de virus durante la amplificación se confirmó por observación de CPE significativo en la monocapa celular. Una vez que se observó CPE, el virus se recolectó de células 293 mediante tres ciclos de congelación-descongelación. Las reservas amplificadas de los virus se usaron para una amplificación adicional antes de que se purificaran los virus mediante bandas dobles de cloruro de cesio para producir reservas de virus purificados.

Actividad del virus evaluada por qPCR

Las células A549, ya sea infectadas durante 72 horas con 1ppc de NG-611, NG-612, NG-617, enadenotucirev o sin infectar, se usaron para la cuantificación del ADN viral mediante qPCR. Los sobrenadantes celulares se recolectaron y se

clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. El ADN se extrajo de 45 µl de sobrenadante mediante el kit Qiagen DNeasy, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó una curva estándar con partículas del virus enadenotucirev (2.5×10^4 - 2.5×10^5 vp) y se extrajo con el kit DNeasy. Cada muestra o estándar extraído se analizó mediante qPCR con un conjunto de sonda-cebador específico del gen viral para el gen E3 temprano.

La cuantificación de la cantidad de genomas virales detectados por célula demostró que NG-611, NG-612 y NG-617 mostraron una replicación significativa del genoma en las líneas celulares A549 (Figura 45D). Esto fue similar para todos los virus evaluados, incluido el virus parental enadenotucirev, lo que indica que la inclusión del transgén activador biespecífico de linfocitos T no afecta la actividad replicativa del virus. No se pudieron detectar genomas virales en células no infectadas (datos no mostrados).

Activación y desgranulación de linfocitos T mediada por los virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T

Infección de célula de carcinoma

Las células A549 se sembraron en placas de 24 cavidades a una densidad de 2.5×10^5 células/cavidad. Las placas se incubaron durante 4 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 1 ppc de NG-611, NG-612, enadenotucirev o se dejaran sin infectar. A las 24, 48 o 72 horas posteriores a la infección, los sobrenadantes se recolectaron de las células, se clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm y se congelaron de manera instantánea.

Ensayo de linfocitos T

Las líneas celulares MRC-5 de fibroblastos de pulmón que expresan FAP, o las células SKOV3 de carcinoma de ovario que expresan EpCam, se sembraron en placas de 48 cavidades a densidades de 5.7×10^4 células/cavidad y 1.2×10^5 células/cavidad, respectivamente. Las placas se incubaron durante 4 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de reemplazar el medio con 150 µL/cavidad de sobrenadante descongelado recolectado de las placas A549. Los linfocitos T CD3 purificados aislados de donantes de PBMC humana también se agregaron a las placas para obtener una relación de linfocitos T con respecto a MRC-5 o SKOV3 de 2 a 1. Los cocultivos se incubaron durante 16 horas, 37 °C, 5 % de CO₂ antes de que los sobrenadantes celulares se recolectaran para el análisis ELISA y de que los linfocitos T se recolectaran para el análisis de citometría de flujo. Los medios de cultivo con células no adherentes se retiraron de las cavidades de cocultivo y se centrifugaron (300xg). El sobrenadante se

retiró con cuidado, se diluyó 1 en 2 en PBS con BSA al 5 % y se almacenó para el análisis de ELISA. Las monocapas de células adherentes se lavaron una vez con PBS y luego se separaron usando tripsina. La tripsina se inactivó con medio RPMI FBS al 10 % y las células se agregaron a los pélets celulares que se habían recogido de los sobrenadantes del cultivo. Las células se centrifugaron (300xg), se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se lavó en 200 µl de PBS. Las células se volvieron a centrifugar y luego se volvieron a suspender en 50 µl de PBS que contenía Live/Dead Aqua (Life tech) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez en amortiguador FAC antes de teñirlas con paneles de anticuerpos conjugados directamente: anti-CD3 conjugado con AF700; anti-CD25 conjugado con BV421; anti-HLA-DR conjugado con PE/CY5; anti-CD40L conjugado con BV605; anti-CD69 conjugado con PE y anti-CD107a conjugado con FITC. Una muestra de células de cada condición de cocultivo también se tiñó con anticuerpos de control de isotipo relevantes. La tinción se llevó a cabo en amortiguador FACS en un volumen total de 50 µl/cavidad durante 15 minutos, a 4 °C. Las células luego se lavaron dos veces con amortiguador FACS (200 µl) antes de que se volvieran a suspender en 200 µl de amortiguador FACS y del análisis mediante citometría de flujo (Attune).

Regulación ascendente de marcadores de activación de linfocitos T

El análisis de citometría de flujo de la activación de linfocitos T se evaluó mediante la expresión de los marcadores de activación de linfocitos T, CD25, CD69, HLA-DR y CD40L, o el marcador de desgranulación de linfocitos T, CD107a, en células individuales vivas. Estos datos mostraron que, cuando se cocultivan con células EpCam⁺ SKOV3, la cantidad de linfocitos T que expresan CD25, CD69, HLA-DR, CD40L o la superficie celular de CD107a aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes de NG-611 a las células en comparación con NG-612, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 47). Para todos estos marcadores, se estimuló poca activación de linfocitos T por sobrenadantes de células A549 infectadas durante 24 horas; sin embargo, a las 48 horas posteriores a la infección, los sobrenadantes estimularon una activación significativa de linfocitos T en todos los marcadores. Este fue también el caso a las 72 horas posteriores a la infección.

Cuando se cocultivan con células FAP⁺ MRC-5, la cantidad de linfocitos T que expresan CD25, CD69, HLA-DR, CD40L o la superficie celular de CD107a aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes de NG-612 a las células en comparación con NG-611, enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar

(Figura 48). También se pudo observar cierta activación de linfocitos T con el virus NG-611, que probablemente se debió a una expresión baja pero detectable de EpCam (~5 %) en las líneas celulares MRC-5 que se acoplan al activador biespecífico de linfocitos T EpCam expresado por el virus NG-611 (Figura 49). Para todos estos marcadores, se estimuló poca activación de linfocitos T por sobrenadantes de células A549 infectadas durante 24 horas; sin embargo, a las 48 horas posteriores a la infección, los sobrenadantes estimularon una activación significativa de linfocitos T en todos los marcadores. Los marcadores CD25 y CD69 también se regularizaron de manera ascendente tras la incubación con los sobrenadantes recolectados a las 72 horas posteriores a la infección; sin embargo, los marcadores de activación, HLA-DR, CD40L y CD107a, se detectaron a niveles más bajos, con los sobrenadantes recolectados a las 72 horas posteriores a la infección en lugar de a las 48 horas posteriores a la infección. Esto podría deberse a los altos niveles de activador biespecífico de linfocitos T presentes en esta etapa tardía de infección, lo que produce una activación rápida y potente de linfocitos T, lo que significa que las funciones efectoras deben medirse en puntos temporales anteriores a las 16 horas posteriores a la incubación con los sobrenadantes.

Para la detección de la expresión de IFN γ , los sobrenadantes de cocultivo se diluyeron en amortiguador de ensayo BSA/PBS al 5 % (en un rango de 1:10 a 1:1000), y ELISA se llevó a cabo mediante el kit ELISA Quantikine de IFN gamma humano (R&D systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de IFN γ segregado se determinó mediante la interpolación de la curva estándar. La expresión de IFN γ solo se pudo detectar en los sobrenadantes de cocultivos con NG-611 en las células SKOV3 (Figura 50A) o NG-611, NG-612 en las células MRC-5 (Figura 50B).

Ejemplo 22: activación inmunitaria y eficacia antitumoral de los virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T in vivo

Las células madre hematopoyéticas CD34+ humanizadas de ratón NSG (de Jackson Labs) se implantaron por vía subcutánea con células tumorales HCT116 en ambos flancos a las 18 semanas posteriores al injerto. Una vez que los tumores alcanzaron 80-400mm³, los ratones se agruparon de tal manera que cada grupo de tratamiento tenía una distribución equivalente de los volúmenes tumorales, 7 ratones por grupo. Los ratones fueron inyectados por vía intratumoral con solución salina, enadenotucirev o NG-611 a 5x10⁹ partículas por inyección, 2 inyecciones por tumor. Se trataron tumores en ambos flancos. El volumen tumoral se midió 3-4 veces por semana y demostró que el tratamiento con NG-611 dio como resultado una respuesta

antitumoral significativa a los 20 días posteriores a la dosis en comparación con enadenotucirev o controles sin tratar (Figura 51a). Después de los 20 días posteriores a la dosis, se procesó un tumor de 4 ratones de cada grupo para realizar una citometría de flujo, mientras que los tumores restantes se congelaron en hielo seco.

Citometría de flujo

Las muestras de tumores se desagregaron de manera mecánica inmediatamente después de la resección en un pequeño volumen de medios RPMI. Los tumores desagregados se pasaron luego a través de un filtro celular de 70 µm y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Los pélets celulares se volvieron a suspender en 100 µl de PBS que contiene Live/Dead Aqua (Life Tech) durante 15 minutos en hielo. Las células se lavaron una vez en amortiguador FAC (BSA al 5 % en PBS) antes de teñirlas con un panel de anticuerpos conjugados directamente: anti-CD8 (RPA-T8, AF700); anti-CD4 (RPA-T4, PE); anti-CD45 (2D1, APC-Fire 750); anti-CD3 (OKT3, PerCP-Cy5.5); anti-CD25 (M-A251, PE-Dazzle 594); anti-CD69 (FN50, APC); anti-HLA-DR (L243, BV605); anti-CD107a (H4A3, FITC). También se tiñó una agrupación de suspensiones de células tumorales con anticuerpos de control de isotipo relevantes. La tinción se llevó a cabo en amortiguador FACS en un volumen total de 50 µl/cavidad durante 20 minutos, a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con amortiguador FACS (200 µl) antes de que se volvieran a suspender en 200 µl de amortiguador FAC y del análisis mediante citometría de flujo (Attune). El análisis de FAC demostró que la relación de linfocitos T CD8 con respecto a CD4 en el tumor aumentó significativamente en los tumores tratados con NG-611 en comparación con los controles tratados con enadenotucirev o sin tratar (Figura 51b).

Ejemplo 23 - Virus EnAd que coexpresan activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y quimiocinas y citocinas inmunomoduladoras

Se generaron tres virus (NG-615, NG-640 y NG-641) que codificaban un activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP y proteínas inmunomoduladoras (Tabla 9).

Tabla 9

ID del virus	Casete de transgén
NG-615 (SEQ ID NO: 82)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -E2A ³ -Flt3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1α ⁶ -T2A ⁷ -IFNα ⁸ -PA ⁹
NG-640 (SEQ ID NO: 83)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -PA ⁶
NG-641 (SEQ ID NO: 84)	SSA ¹ -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ⁵ -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -E2A ³ -IFNα ⁸ -PA ⁶

NG-615 (SEQ ID NO: 278)	SA ¹² -activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP ² -E2A ³ -Flt3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1α ⁶ -T2A ⁷ -IFNα ⁸ -PA ⁹
-------------------------	--

Producción del virus

El plásmido pEnAd2.4 se usó para generar los plásmidos pNG-615, pNG-616, pNG-640 y pNG-641 mediante la inserción directa de casetes de transgén sintetizados (SEQ ID NO: 93-95, respectivamente). NG-615 y NG-616 contienen cuatro transgenes que codifican un activador biespecífico de linfocitos T que se dirige a FAP (SEQ ID NO: 75), Flt3L (SEQ ID NO. 96), MIP1α (SEQ ID NO. 97) y IFNα (SEQ ID NO. 98). NG-640 y NG-641 codifican un activador biespecífico de linfocitos T que se dirige a FAP (SEQ ID NO. 75), CXCL9 (SEQ ID NO. 99) y CXCL10 (SEQ ID NO. 100). NG-641 también contiene un cuarto transgén que codifica IFNα (SEQ ID NO. 98). La construcción del ADN de plásmido se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación del ADN.

Los plásmidos, pNG-615, pNG-616, pNG-640 y pNG-641, se alinearon mediante digestión de restricción con la enzima *AscI* para producir los genomas virales. Los virus se amplificaron y se purificaron de acuerdo con los métodos que se detallan en el Ejemplo 33.

Actividad del virus evaluada por qPCR y ELISA de transgén

Infección de célula de carcinoma

Las células A549, ya sea infectadas durante 72 horas con 1ppc de NG-615, enadenotucirev o sin infectar, se usaron para la cuantificación del ADN viral mediante qPCR y análisis de la expresión de transgén mediante ELISA. Los sobrenadantes celulares se recolectaron y se clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm. Se utilizaron 45 µl de sobrenadante para el análisis de ADN, y el sobrenadante restante se utilizó para ELISA.

qPCR

El ADN se extrajo de muestra de sobrenadante con el kit Qiagen DNeasy, de acuerdo con el protocolo del fabricante. También se preparó una curva estándar con partículas del virus enadenotucirev (2.5e10-2.5e5vp) y se extrajo con el kit DNeasy. Cada muestra o estándar extraído se analizó mediante qPCR con un conjunto de sonda-cebador específico del gen viral para el gen E3 temprano. La cuantificación de la cantidad de genomas virales detectados por célula demostró que NG-615 mostró una replicación significativa del genoma en las líneas celulares A549 a un nivel similar que el del virus parental enadenotucirev (Figura 52). Estos datos indicaron que la inclusión del activador biespecífico de linfocitos T y tres transgenes

inmunomoduladores no tiene un impacto significativo en la actividad replicativa del virus. No se pudieron detectar genomas virales en células no infectadas.

ELISA

IFN α ELISA se llevó a cabo mediante el kit Verikine de IFN alfa humano (Pbl assay science), MIP1 α ELISA se llevó a cabo mediante el kit ELISA Quantikine de CCL3 humano (R & D systems) y Flt3L ELISA se llevó a cabo mediante el kit ELISA de Flt3L humano (Abcam). Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Las concentraciones de IFN α , MIP α o FLt3L segregados se determinaron mediante la interpolación de las curvas estándar. La expresión de IFN α , MIP1 α y Flt3 L se pudo detectar en el sobrenadante celular de NG-615, pero no en las células de control sin tratar o de enadenotucirev (Figura 53).

Activación y desgranulación de linfocitos T mediada por los virus que expresan activador biespecífico de linfocitos T

Infección de célula de carcinoma

Las células A549 se sembraron en placas de 24 cavidades a una densidad de 2.5e5 células/cavidad. Las placas se incubaron durante 4 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de que las células se infectaran con 1 ppc de NG-612, NG-615, enadenotucirev o se dejaran sin infectar. A las 24, 48 o 72 horas posteriores a la infección, los sobrenadantes se recolectaron de las células, se clarificaron mediante centrifugación durante 5 minutos, 1200 rpm y se congelaron de manera instantánea.

Ensayo de linfocitos T

Las líneas celulares MRC-5 de fibroblastos de pulmón que expresan FAP se sembraron en placas de 48 cavidades a una densidad de 5.7e4 células/cavidad. Las placas se incubaron durante 4 horas, 37 °C, 5 % de CO₂, antes de reemplazar el medio con 150 μ L/cavidad de sobrenadante descongelado recolectado de las placas A549. Los linfocitos T CD3 purificados aislados de donantes de PBMC humana también se agregaron a las placas para obtener una relación de linfocitos T con respecto a MRC-5 de 2 a 1. Los cocultivos se incubaron durante 16 horas, 37 °C, 5 % de CO₂ antes de que los sobrenadantes celulares se recolectaran para el análisis ELISA y de que los linfocitos T se recolectaran para el análisis de citometría de flujo de acuerdo con los métodos detallados en el Ejemplo 29.

Regulación ascendente de marcadores de activación de linfocitos T

El análisis de citometría de flujo de la activación de linfocitos T se evaluó mediante la expresión de los marcadores de activación de linfocitos T, CD25, CD69,

HLA-DR y CD40L, o el marcador de desgranulación de linfocitos T, CD107a, en linfocitos individuales CD3⁺ vivos. Estos datos muestran que, cuando se cocultivan con células FAP⁺ MRC-5, la cantidad de linfocitos T que expresan CD25, CD69, HLA-DR, CD40L o CD107a aumentó significativamente cuando se agregaron sobrenadantes de NG-615 o 612 a las células en comparación con enadenotucirev o sobrenadantes de control sin tratar (Figura 54).

Secreción de la citocina estimuladora IFN γ

Para la detección de la expresión de IFN γ , los sobrenadantes de cocultivo se diluyeron en amortiguador de ensayo BSA/PBS al 5% (en un rango de 1:10 a 1:1000), y ELISA se llevó a cabo mediante el kit Quantikine de IFN gamma humano (RandD Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de IFN γ segregado se determinó mediante la interpolación de la curva estándar. La expresión de IFN γ solo se pudo detectar en los sobrenadantes de cocultivos mediante los sobrenadantes de A549 infectados con NG-612 o NG-615 (Figura 55).

SEQ ID NO: 95 casete de transgén para NG-641

CAGGCCCCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCTTGTTTCCTGGTCGCAACTGCTACCGGAGTCCAT
TCGGACATCGTCATGACCCAAAGCCCTGACTCGCTCGCTGTGTCACTGGGAGAGCGGGCGACTA
TCAACTGCAAATCATCCCAGAGCCTGCTGTATTACGCAATCAGAAAACTACCTGGCCTGGTA
TCAGCAGAAGCCGGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTTCTGGGCCTCCACCCGCGAAAGCGGC
GTGCCGGACCGCTTCAGCGGAAGCGGATTTCGGAAGTACTTTACTCTGACCATTAGCTCCTTGC
AGGCGGAGGACGTGGCCGTCTACTACTGCCAGCAGTATTTCTCCTATCCGCTCACCTTTGGGCA
AGGCACCAAGGTGGAGATTAAGGGAGGGGGCGGCAGCGGGGAGGCGGCAGCGGCGGCGGGGA
TCGCAGGTCCAGCTCGTCCAATCCGGAGCCGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCGTCGGTCAAGGTCA
GCTGCAAACTTCGCGCTACACCTTCACTGAGTACACGATCCACTGGGTCCGCCAGGCGCCCCG
CCAGCGGCTGGAGTGGATCGGCGGGATCAACCCAAACAACGGAATCCCAAATTACAATCAGAAA
TTTAAAGGGCGGGTGAAGTATCACCGTGGATACCTCGGCCTCCACGGCGTACATGGAGCTCTCAT
CACTCAGATCGGAGGACACCGCGGTCTATTACTGCGCCCCGCCCGGATCGCTTATGGATACGA
TGAAGGACATGCGATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTCACGGTGTGTCAGGAGGCGGC
GGTTCACAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGA
TGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAAACAGAGGCC
TGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAG
AAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGA
GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTG
CCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGT
GGTGGATCTGGTGGCGGCGGATCTGATATCGTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT
CTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGGTA
CCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGA
GTCCCTGCTCACTTCAGGGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGG
AGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCTC
GGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGGGAAGCGGAGCTACTAATTACAGCCTGCTGAAGCAGGCT
GGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTAATCAAAGTCCATTTCTGATTTGCTGCCTTATCTTTC
TGAAGTCTAAGTGGCATTCAAGGAGTACCTCTCTCTAGAACTGTACGCTGTACCTGCATCAGCAT
TAGTAATCAACCTGTTAATCCAAGGTCTTTAGAAAACTTGAAATTATTCCTGCAAGCCAATTT
TGTCCACGTGTTGAGATCATTGCTACAATGAAAAAGAAGGGTGAGAAGAGATGTCTGAATCCAG
AATCGAAGGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGTCTAAAAGATCTCCTGG
AAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCTAAG
AAAAGTGGTGTCTTTTCTCTTGGGCATCATCTTGCTGGTTCTGATTGGAGTGCAAGGAACCC
CAGTAGTGAGAAAGGGTCGCTGTTCTGCTGCATCAGCACCAACCAAGGGACTATCCACCTACAATC
CTTGAAAGACCTTAAACAATTTGCCCCAAGCCCTTCTGCGAGAAAATTGAAATCATTGCTACA
CTGAAGAATGGAGTTCAAACATGTCTAAACCCAGATTCAGCAGATGTGAAGGAAGTGAATAAAA

AGTGGGAGAAACAGGTCAGCCAAAAGAAAAAGCAAAAGAATGGGAAAAACATCAAAAAAGAA
AGTTCTGAAAGTTCGAAAATCTCAACGTTCTCGTCAAAAGAAGACTACAGGAAGCGGACAGTGT
ACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAACCCTGGACCTGCCTTGACCT
TTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCT
GCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATC
TCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGAGTTTGGCAACC
AGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTT
CAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATTCTACACTGAACTC
TACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCC
TGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAA
AGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCT
TTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTAGCTTGACTGACTGAGATA
CAGCGTACCTTCAGCTCACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAG
AATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATT
ATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGG
AGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAGTCGTCAGCTAT

Figura 1

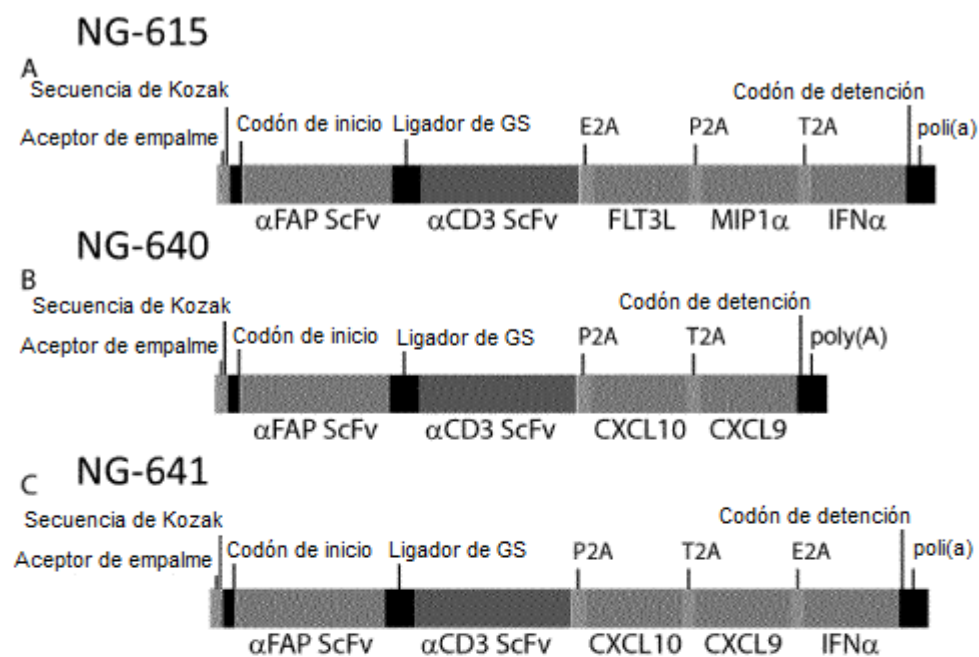


Figura 2A

Replicación del virus en células A549

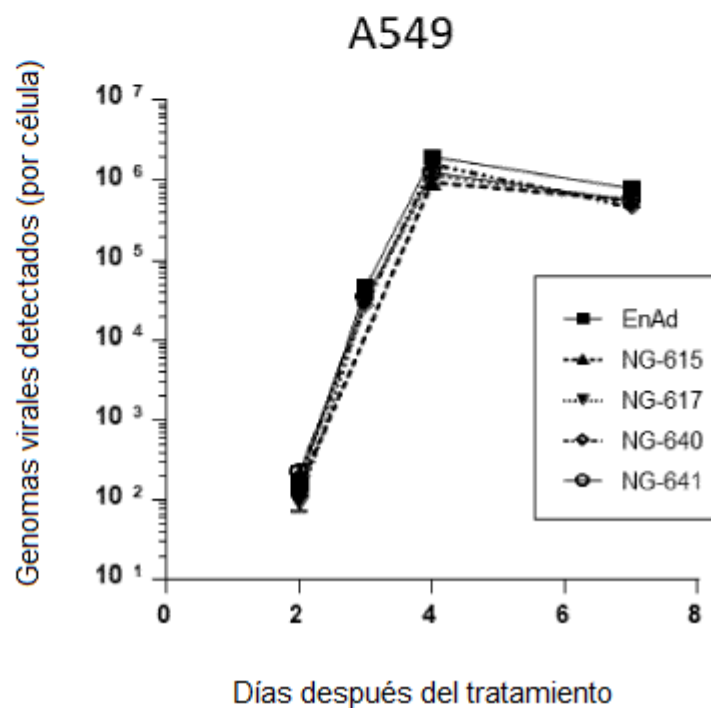
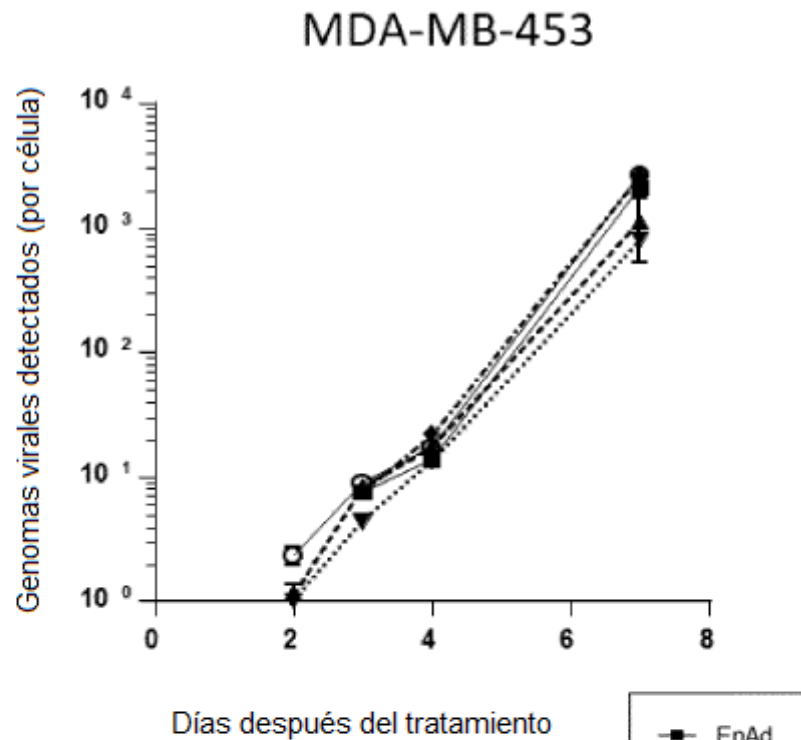
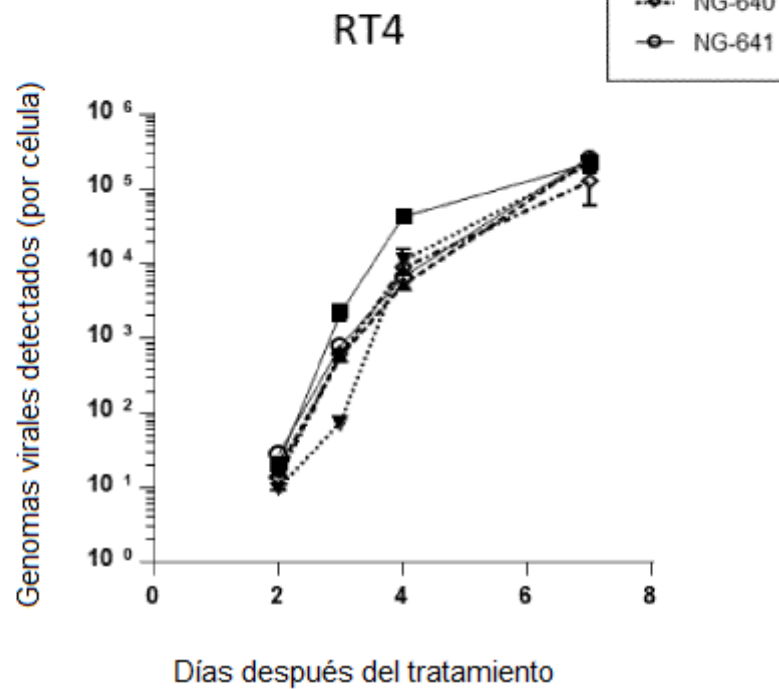


Figura 2B Replicación del virus en células MDA-MB-453**Figura 2C** Replicación del virus en células RT4

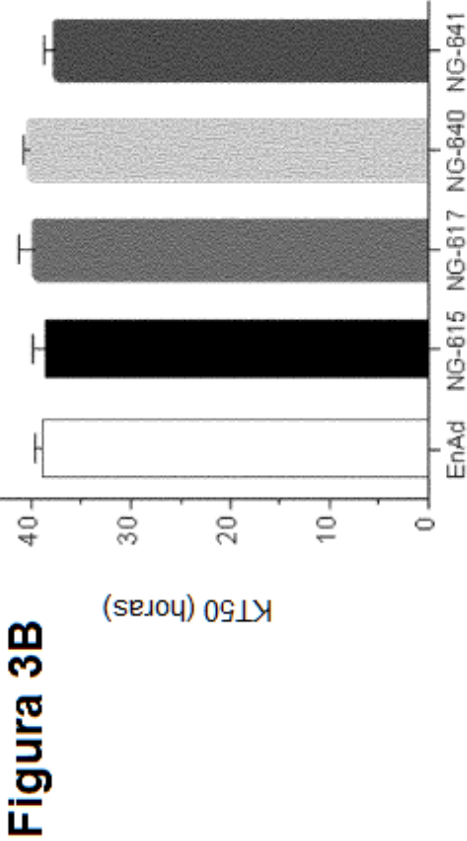
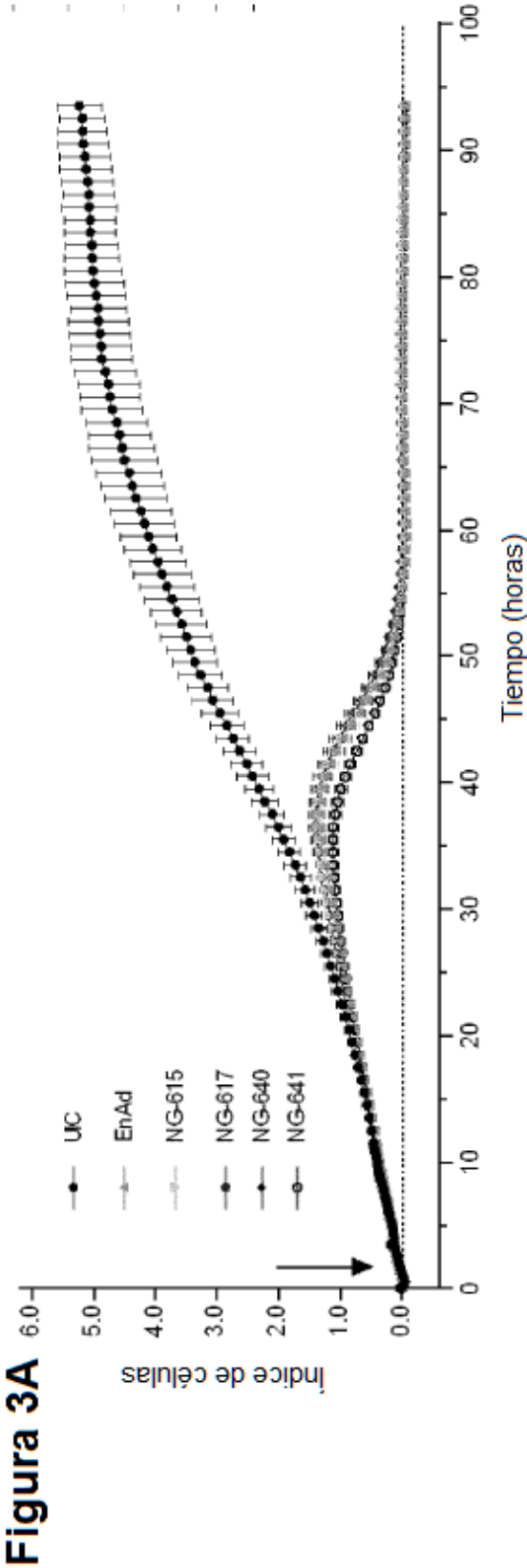


Figura 4 Expresión de transgén de citocinas para NG-615 en células de pulmón y carcinoma

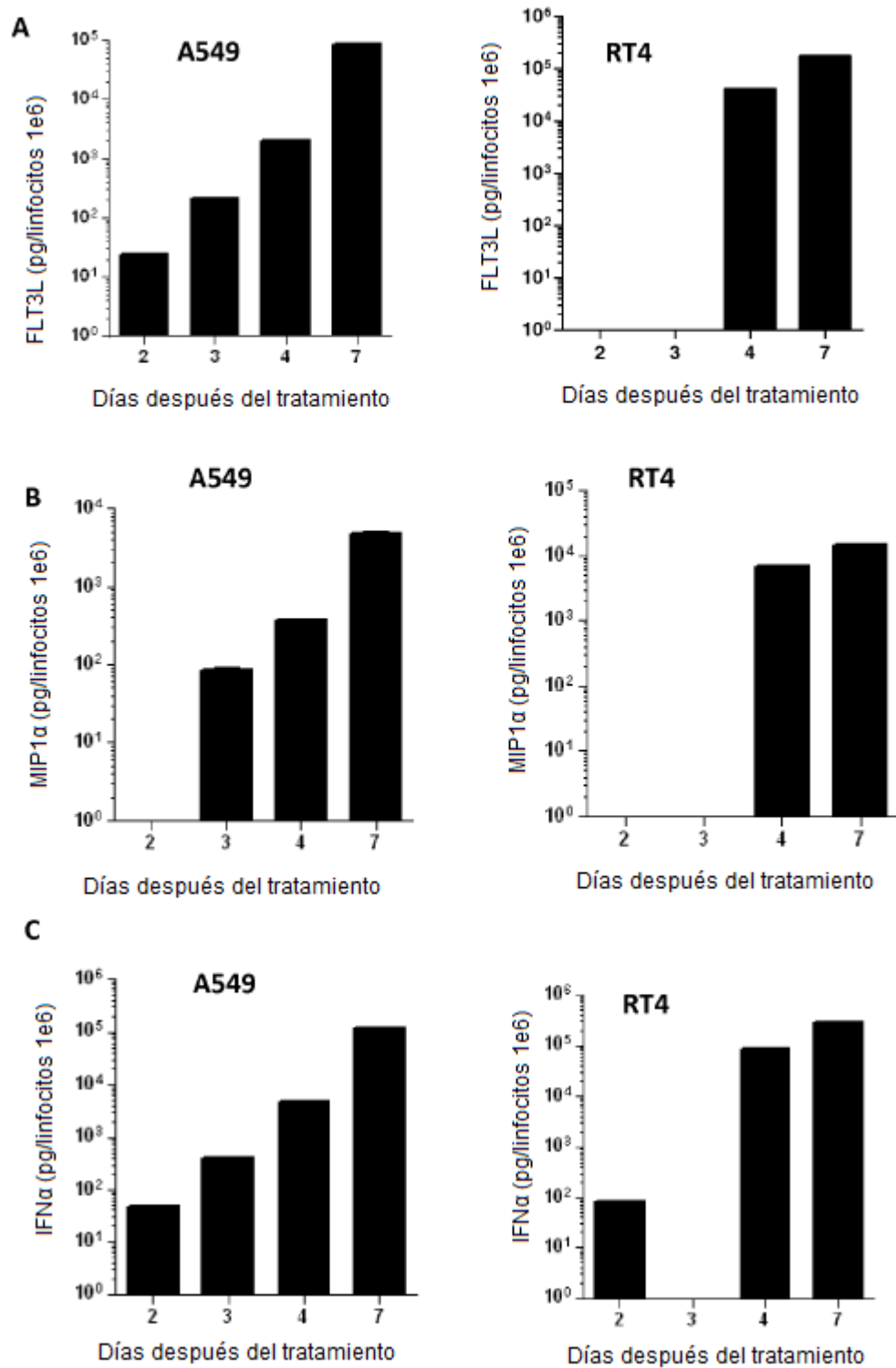


Figura 5 Expresión de transgén de citocinas para NG-641 en células de pulmón y carcinoma

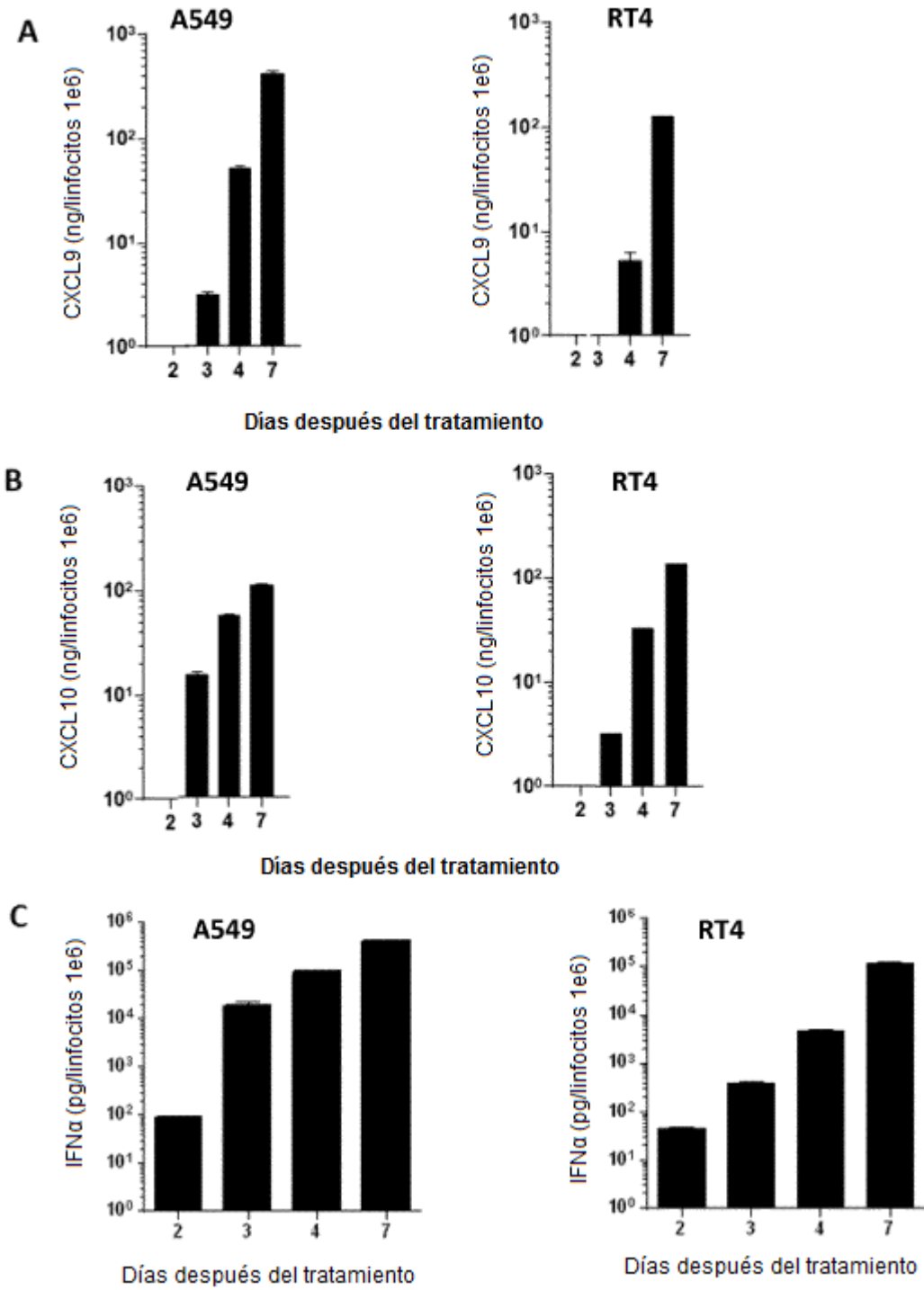


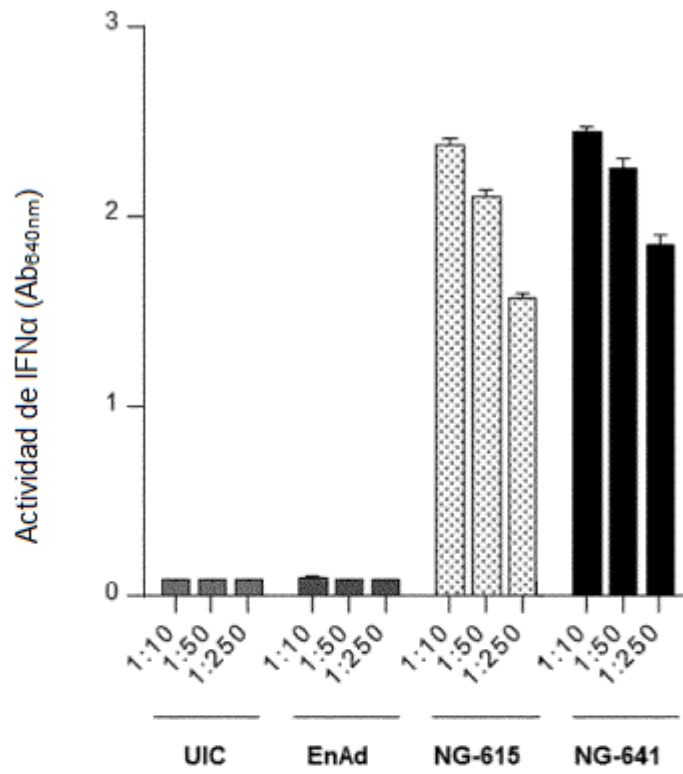
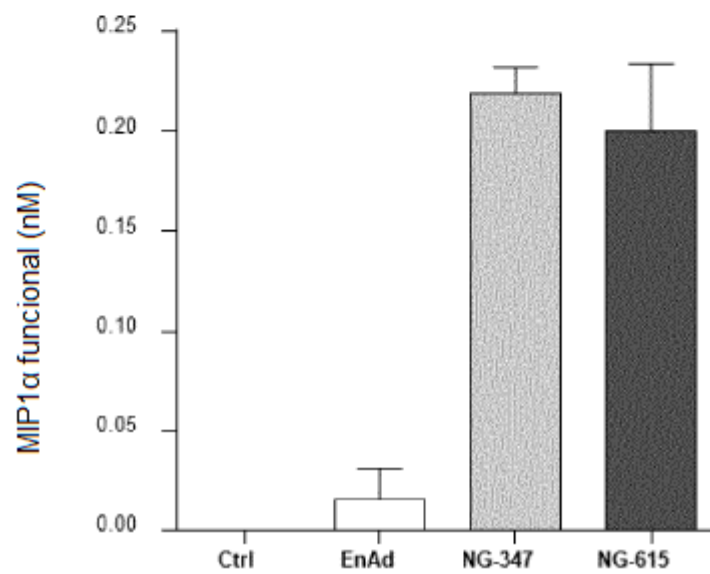
Figura 6A**Figura 6B**

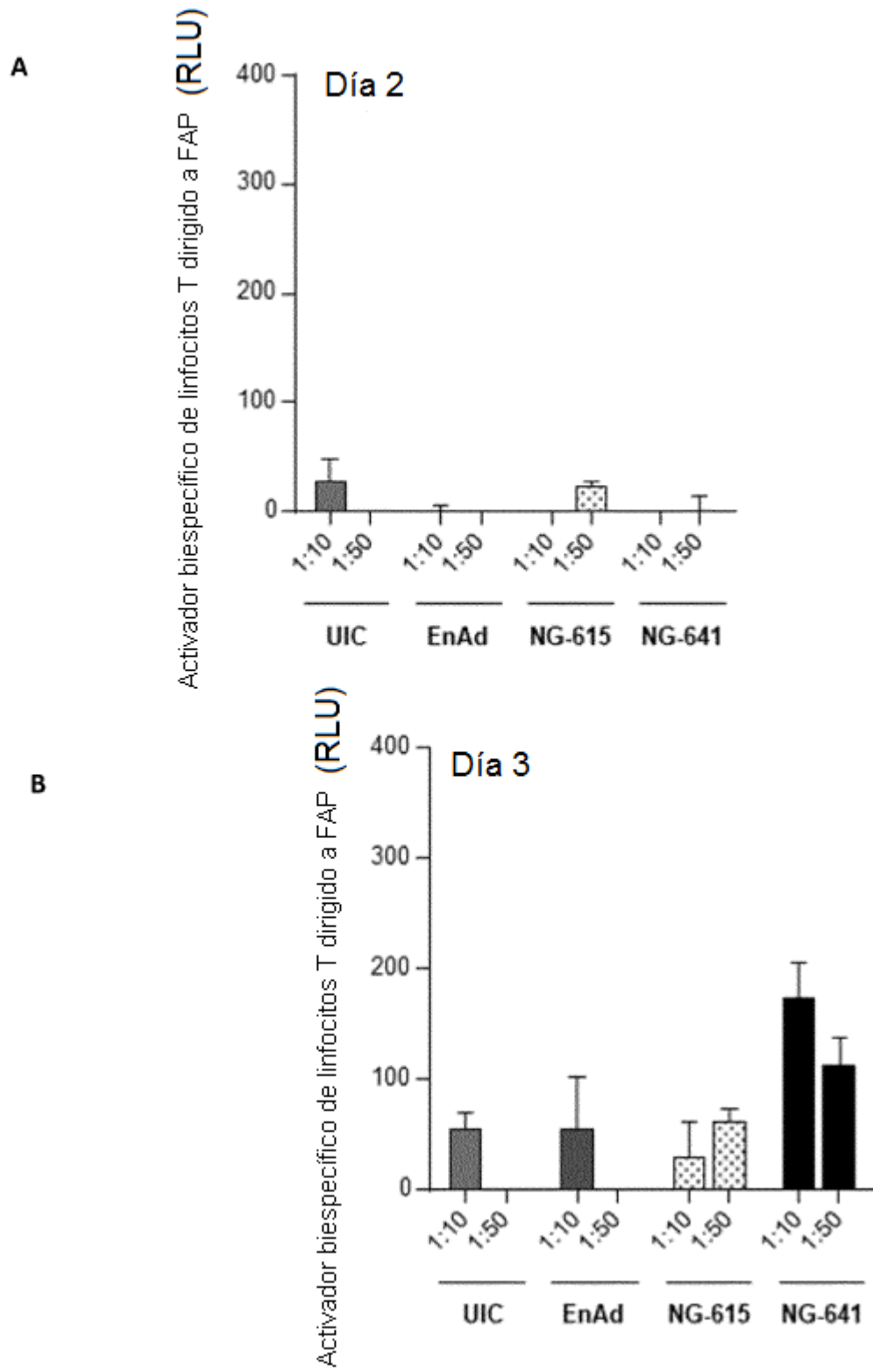
Figura 7

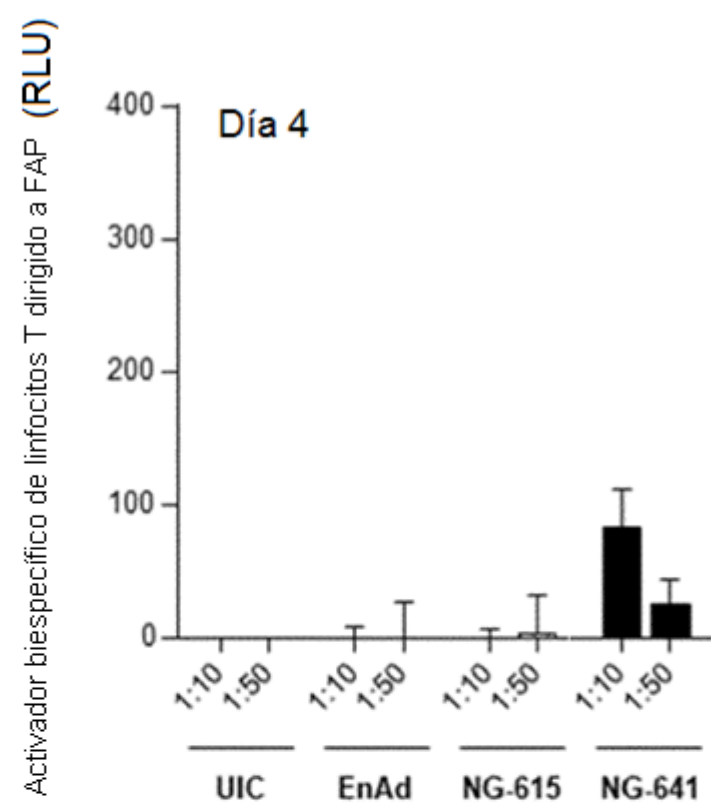
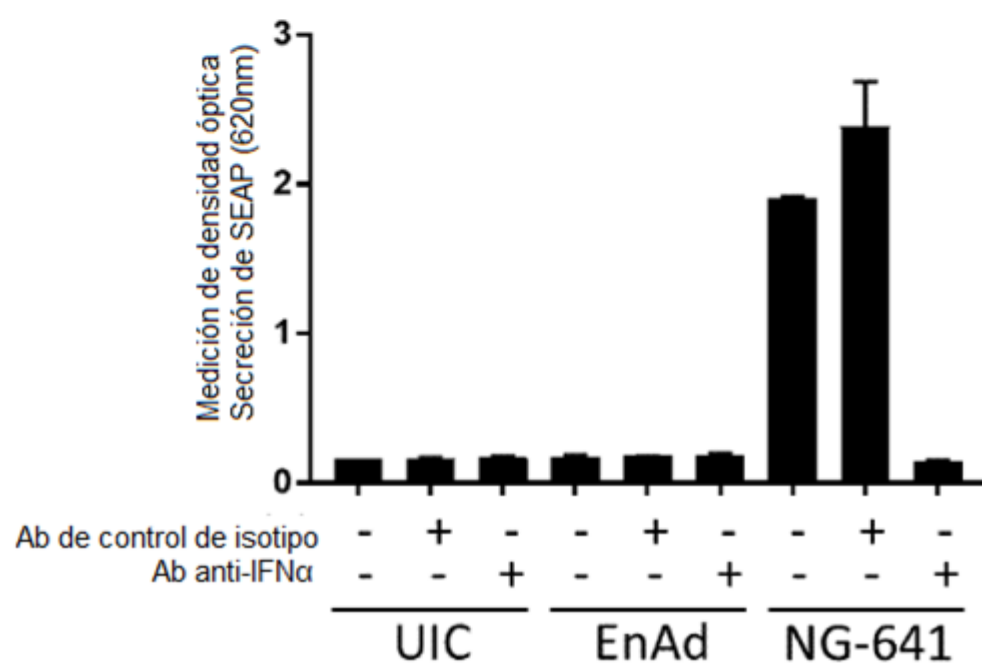
Figura 7C**Figura 8A**

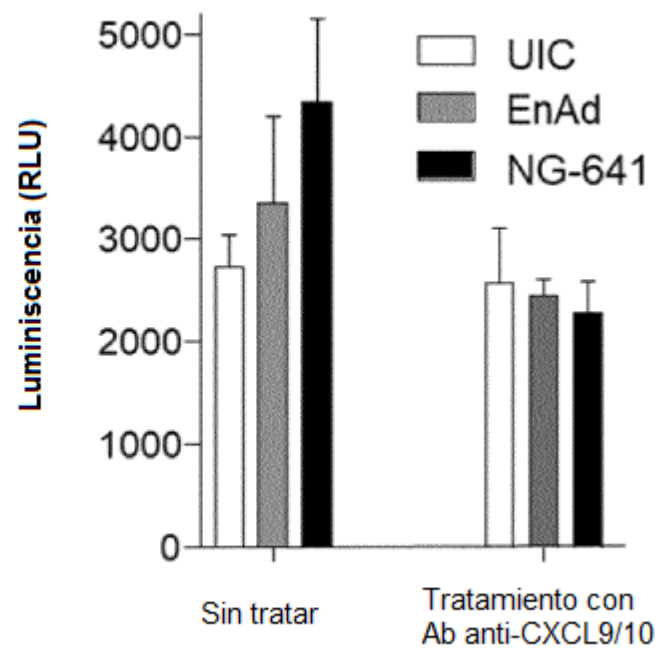
Figura 8B

Figura 9

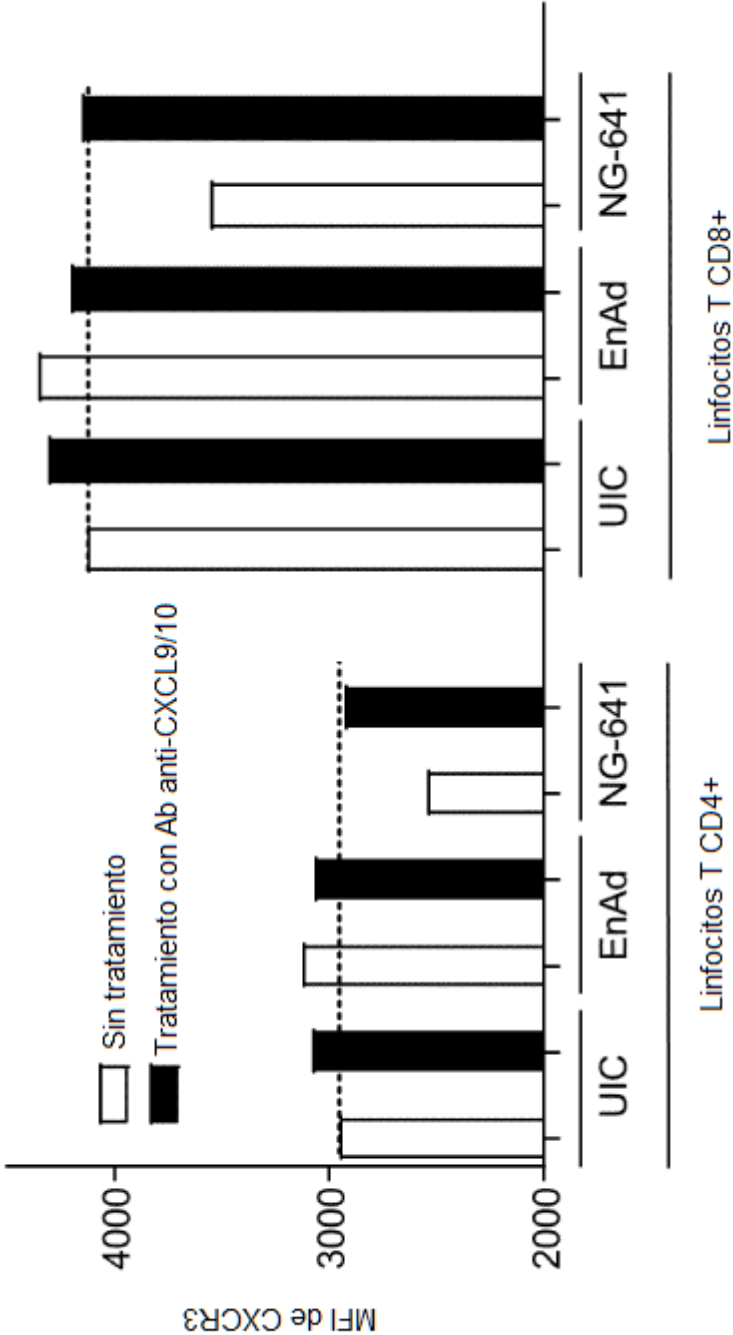


Figura 10A

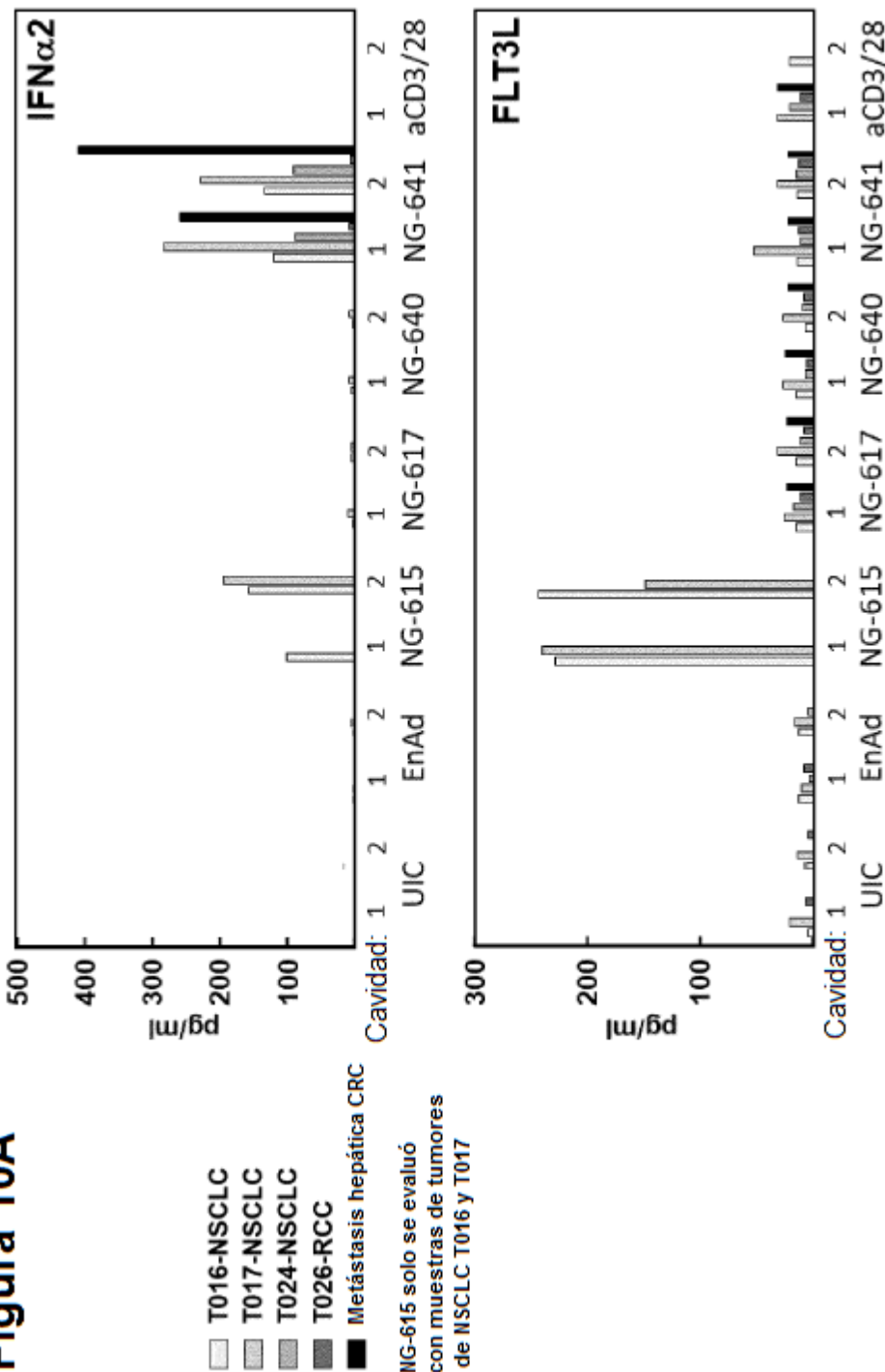


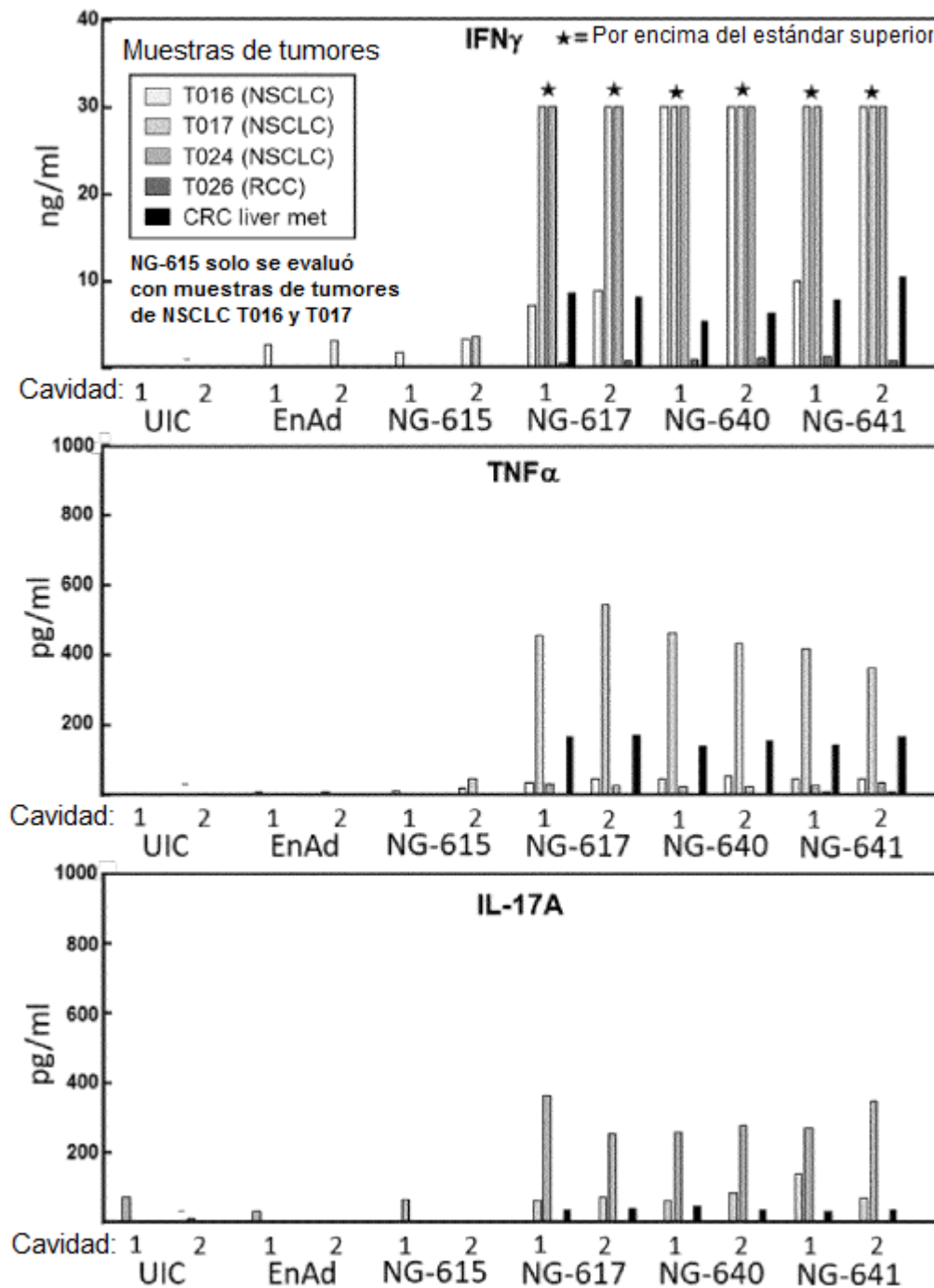
Figura 10B

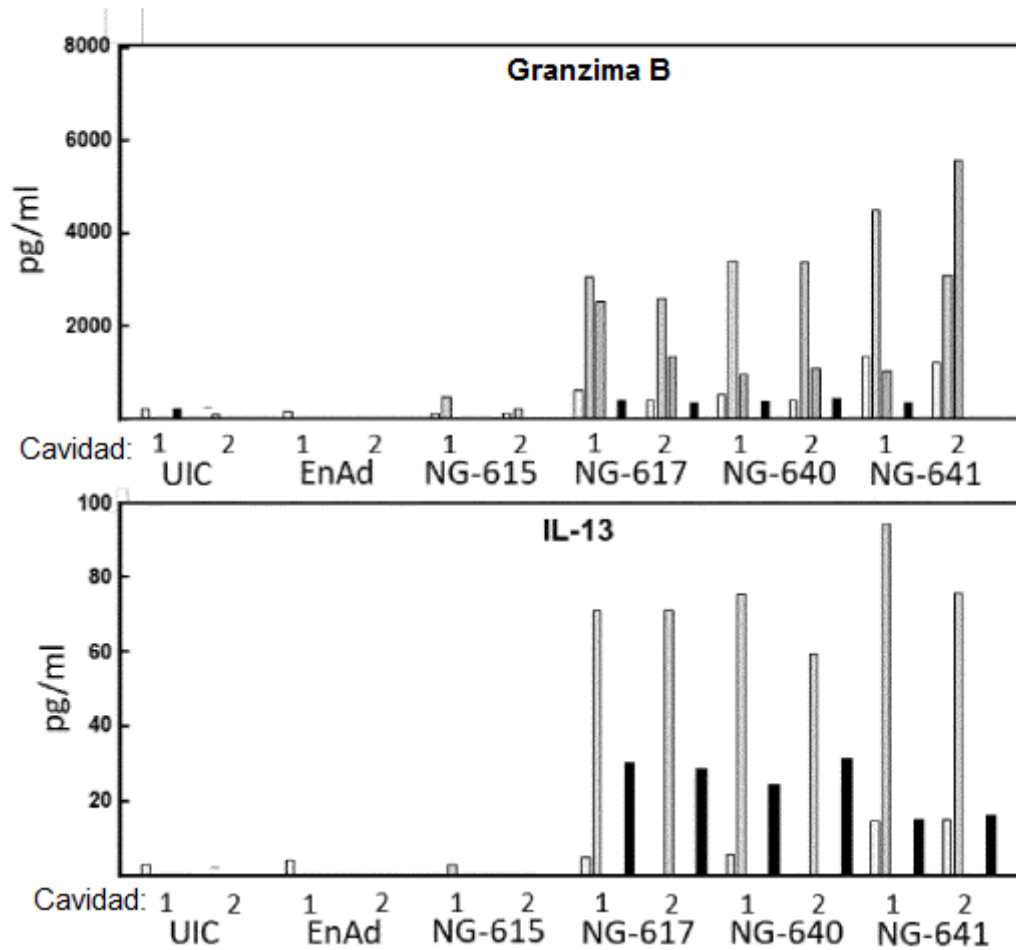
Figura 10B cont.

Figura 11A (eje X Comp-RL1-A:CD69-A, Eje Y Comp-YL4-A: CD25A)

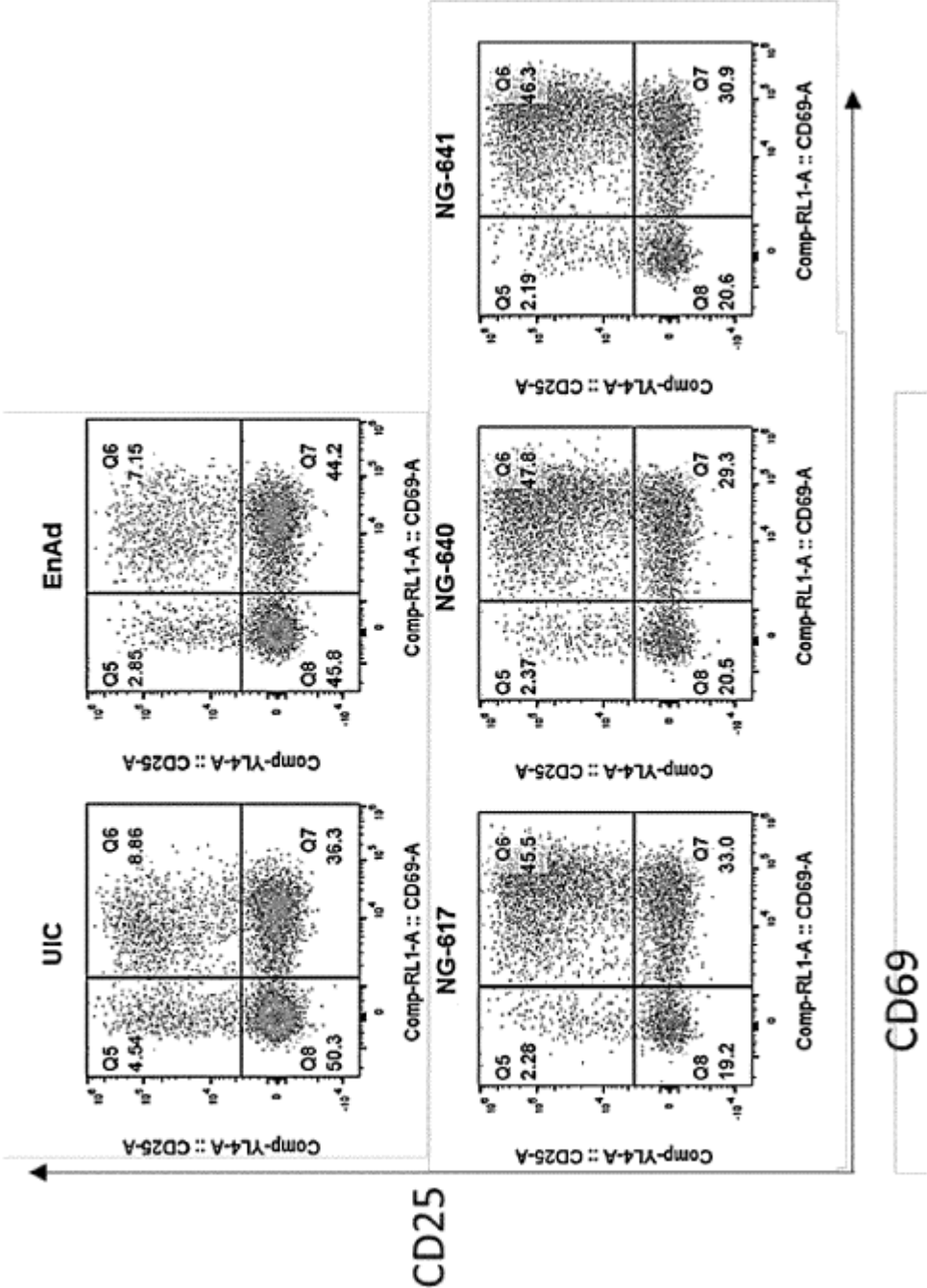


Figura 11A Cont. (Eje X Comp- YL1A:107a-A, Eje Y Comp-YL4-A: CD25-A)

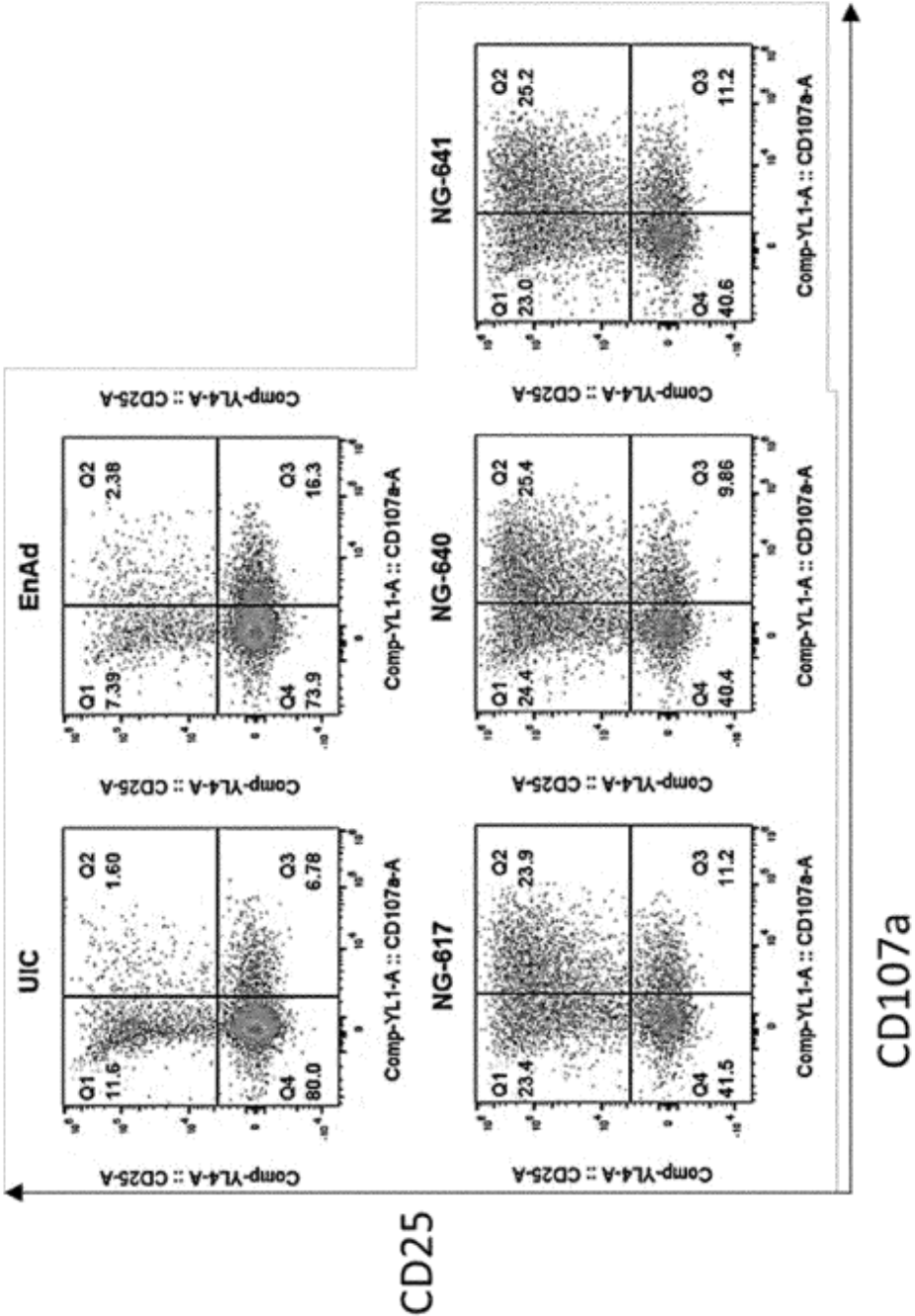


Figura 11B (Eje X Comp-RL1-A:CD69-A, Eje Y Comp-YL4-A: CD25-A)

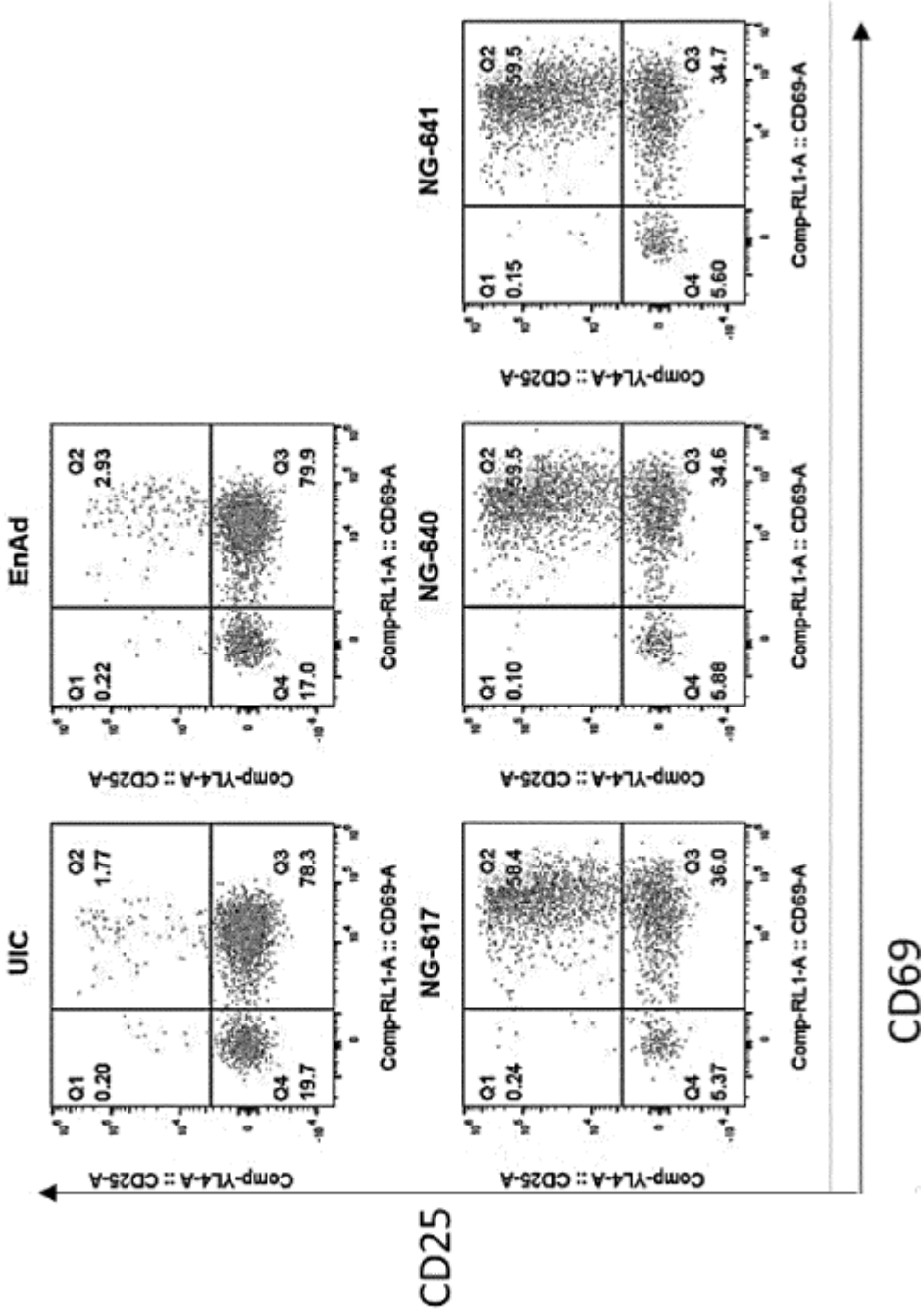


Figura 11B Cont. (Eje X Comp-YL1-1:CD107-a-A, eje Y Comp-YL4-A: CD25-A)

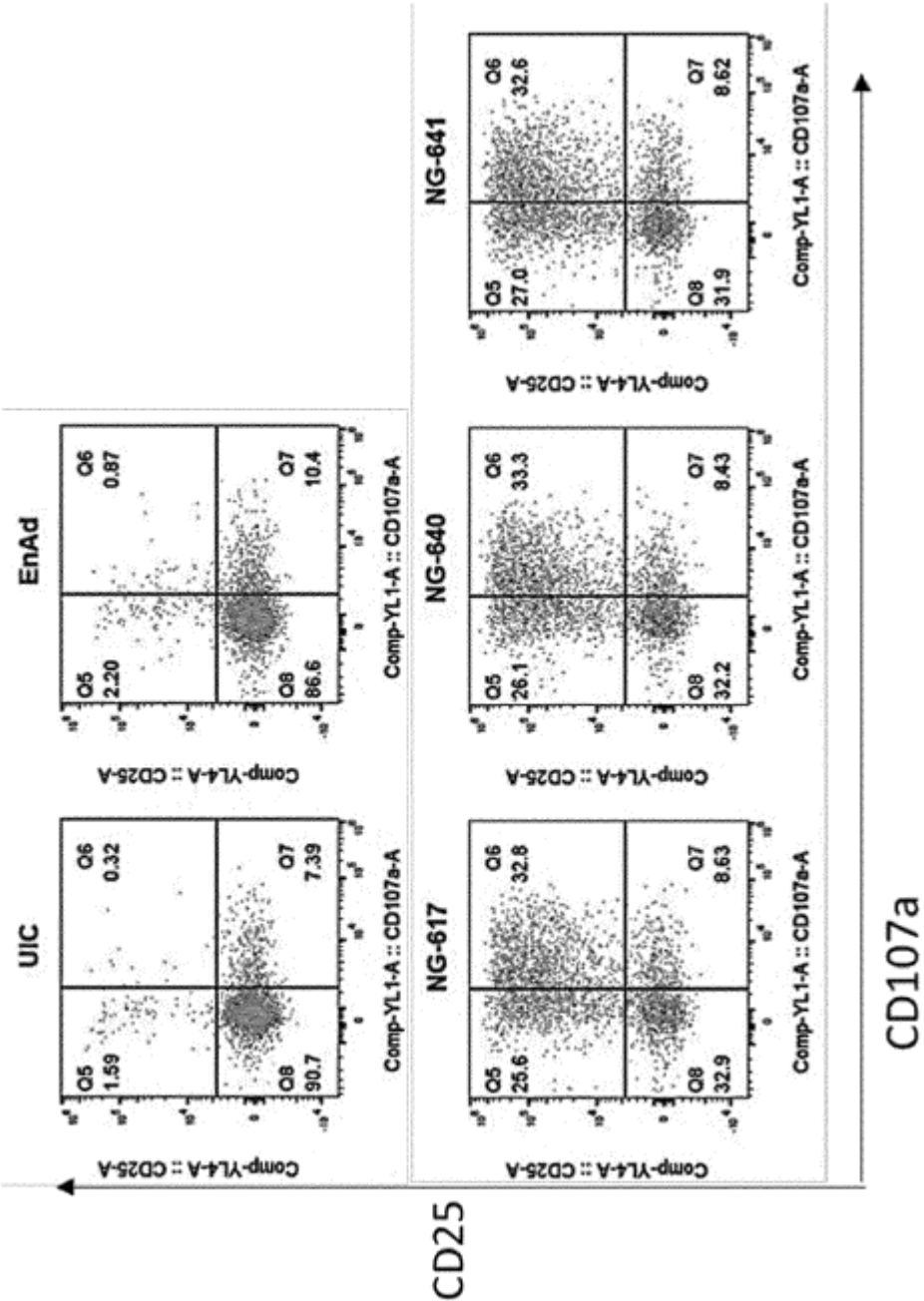


Figura 11C (Eje X Comp-VL-A: IFN-g-A, eje Y Comp-YL4-A: CD25-A)

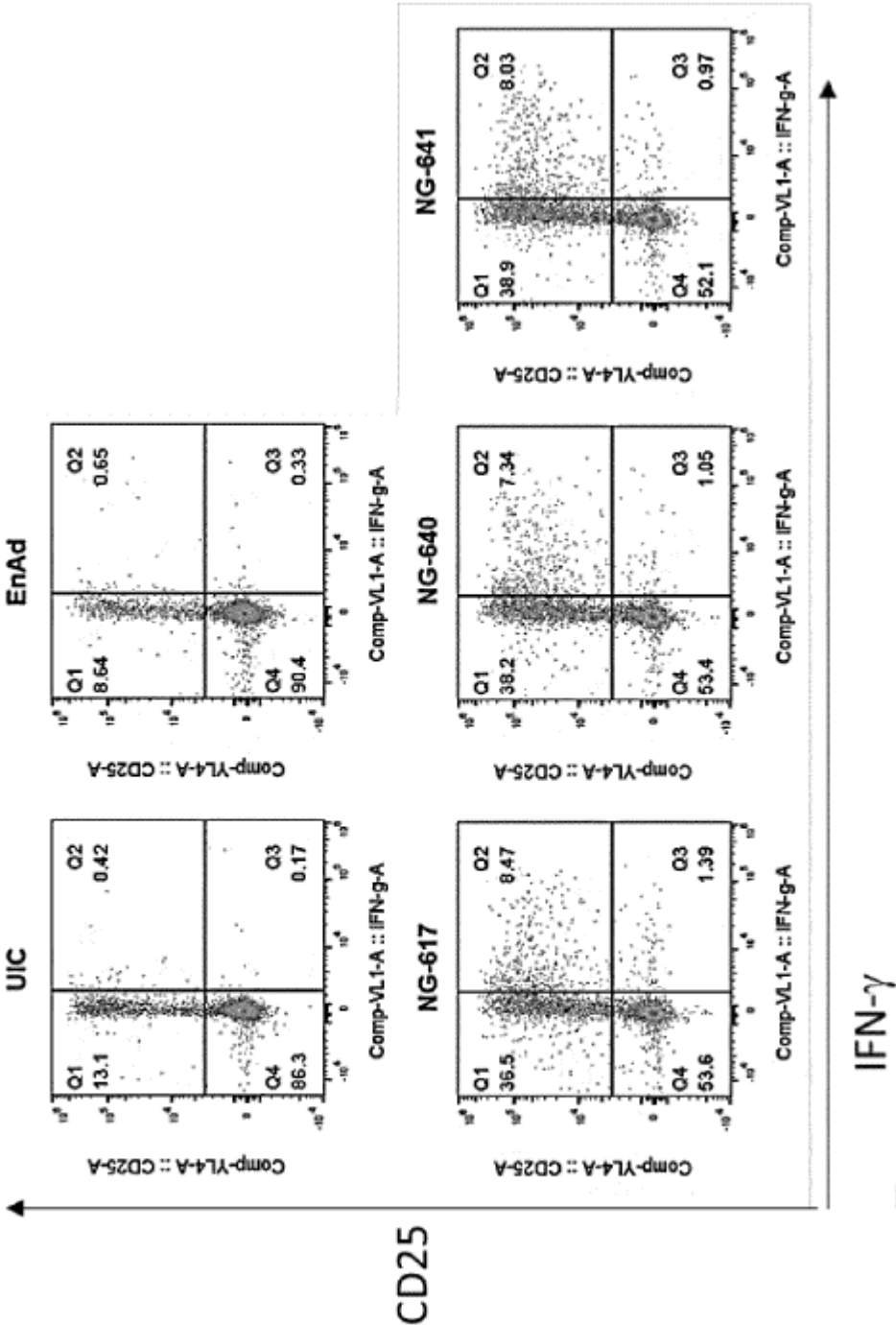


Figura 11C Cont. (Eje X Comp-RL1-A::TNF- α -A, Eje Y Comp-YL4-A::CD25-A)

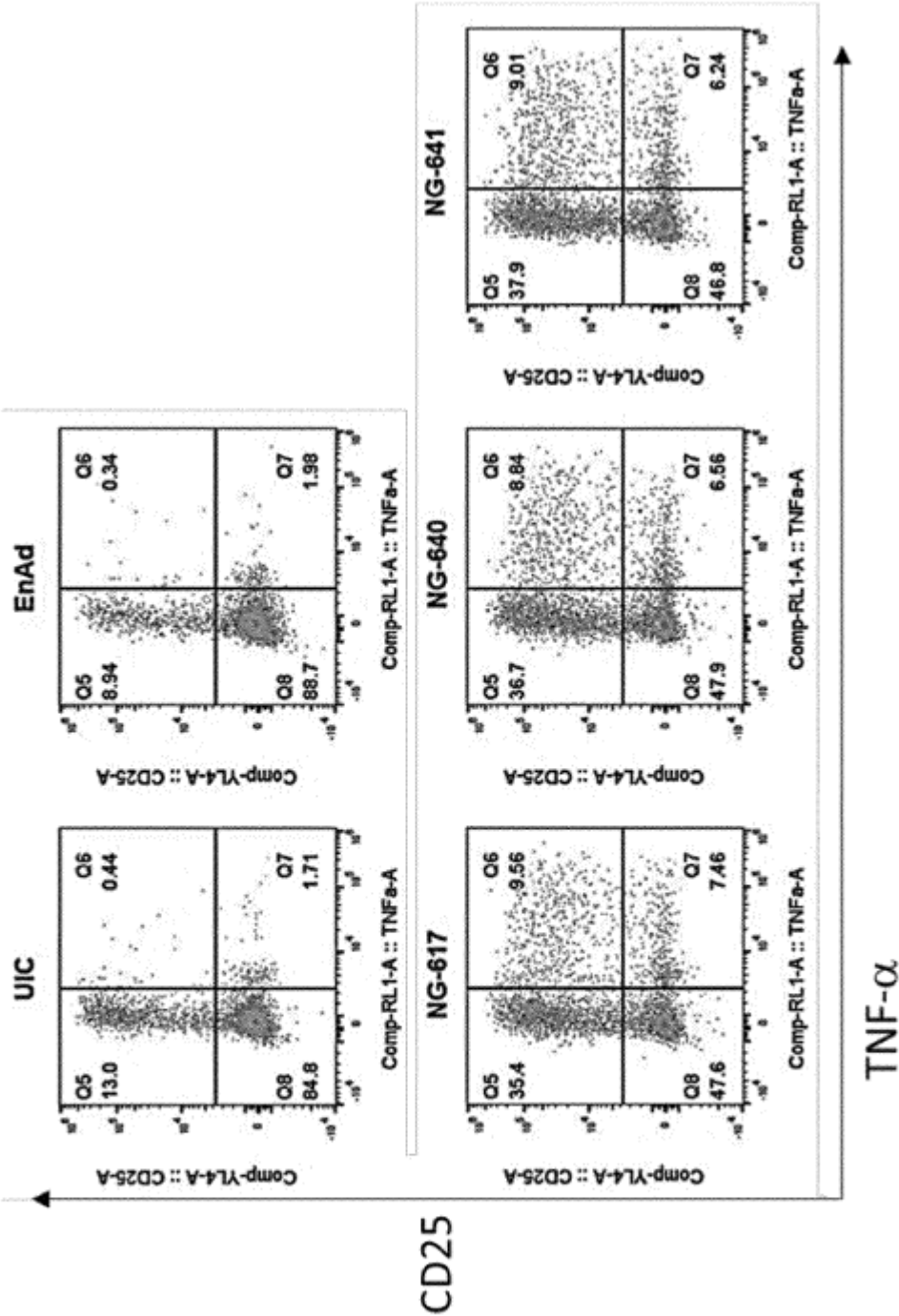


Figura 11D (Eje X Comp-VL-A: IFN-g-A, Eje Y Comp-YL4-A: CD25-A)

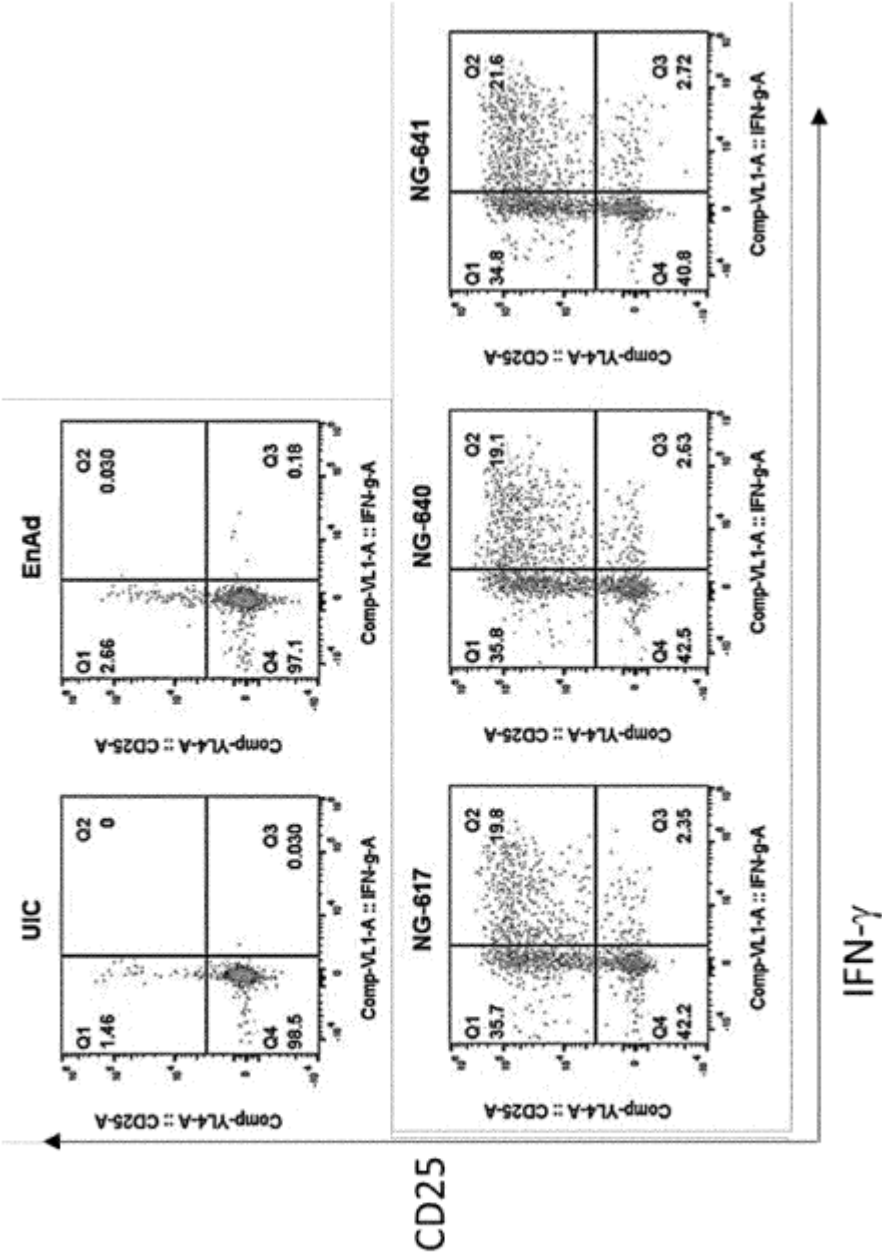


Figura 11D Cont. (Eje x Comp-RL1-A: TNN-a-A, Y-axis Comp-YL4-A: CD25-A)

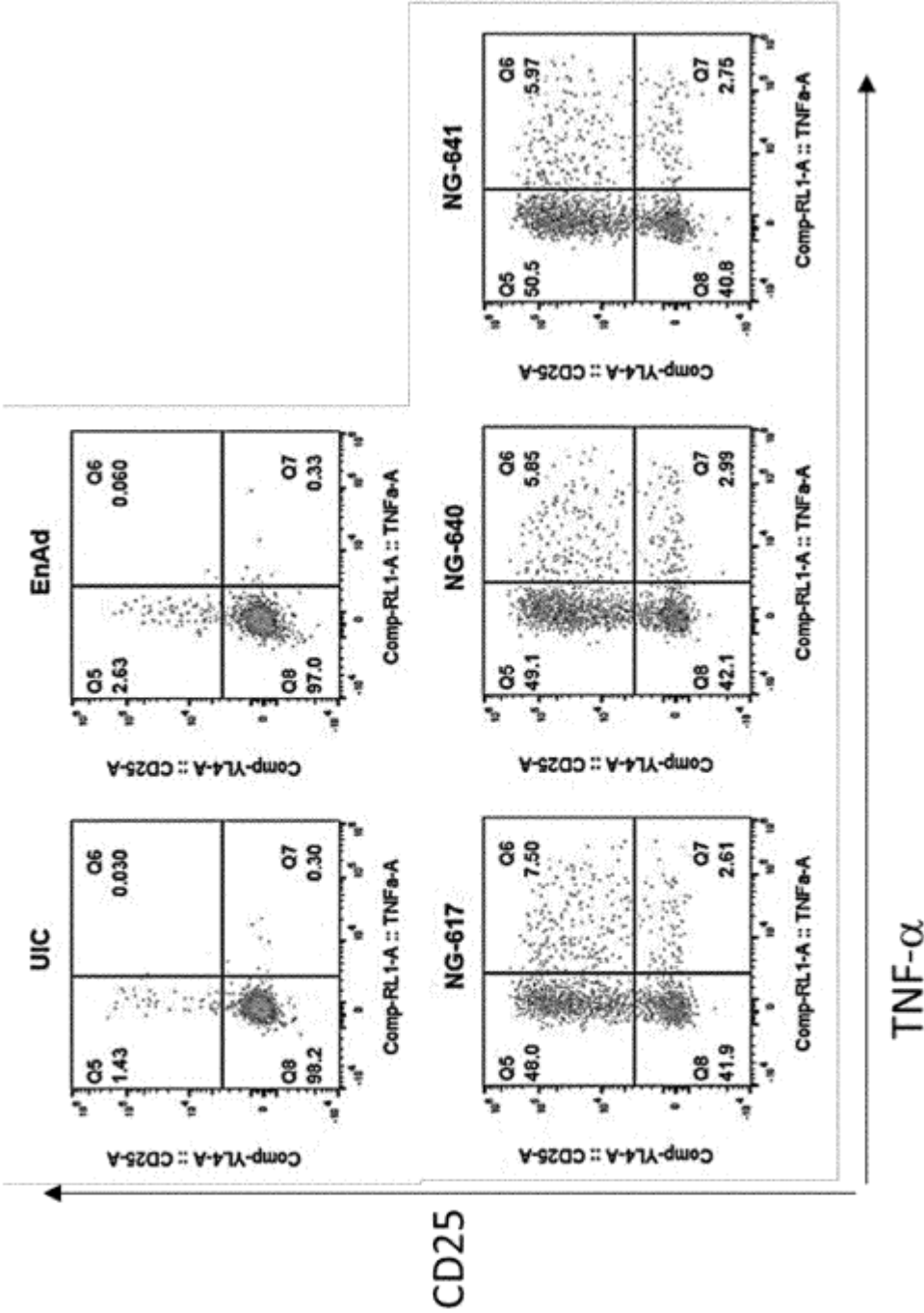


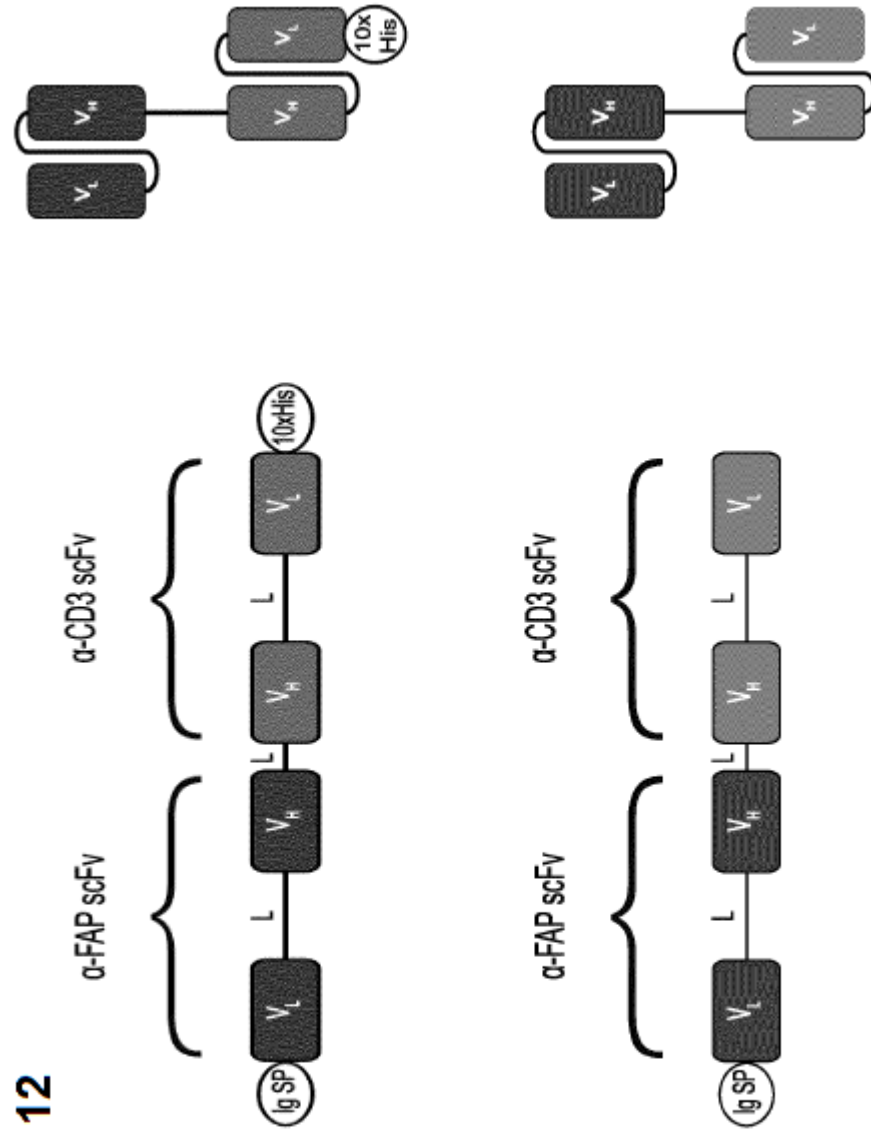
Figure 12

Figura 13

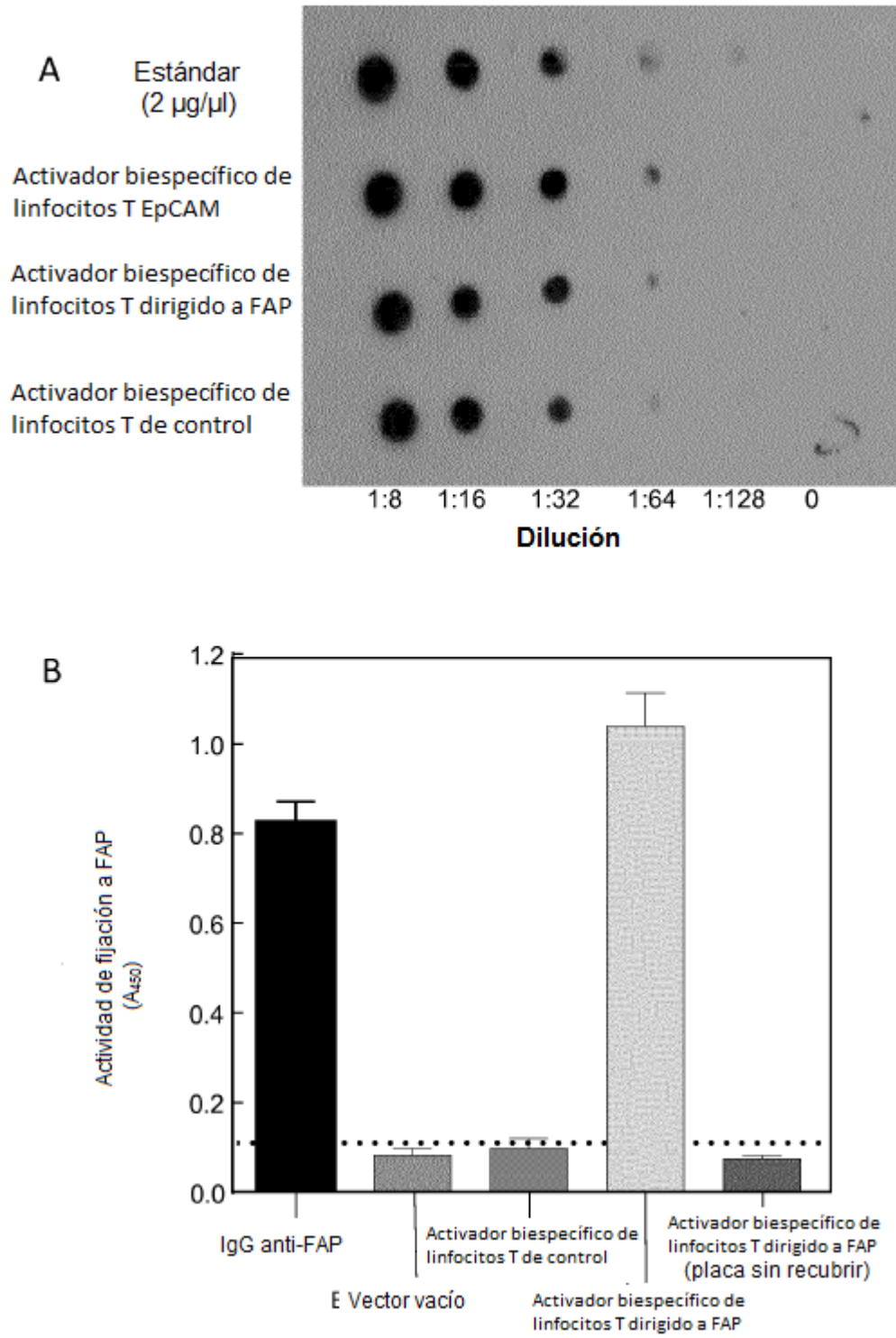


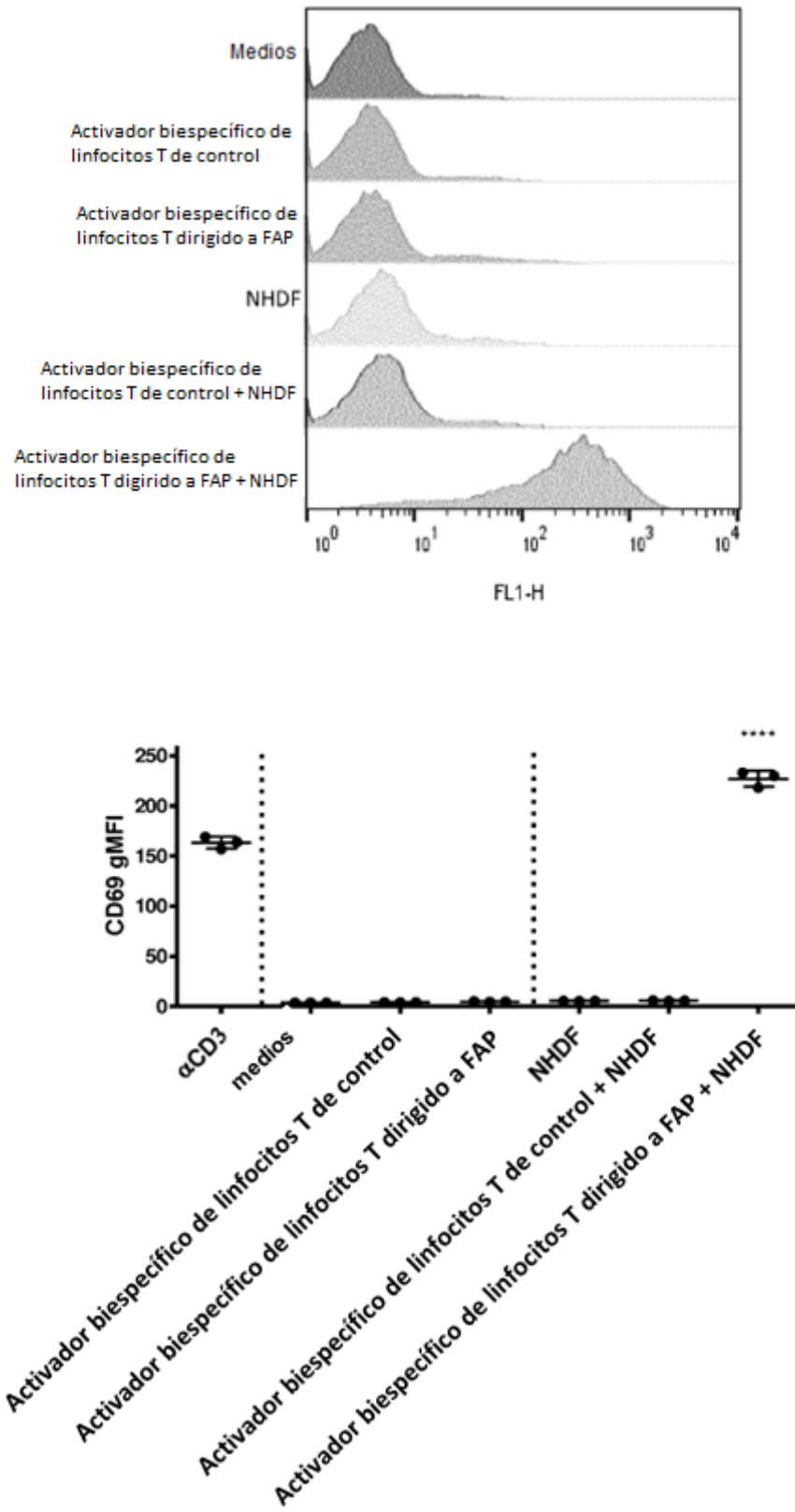
Figura 14A

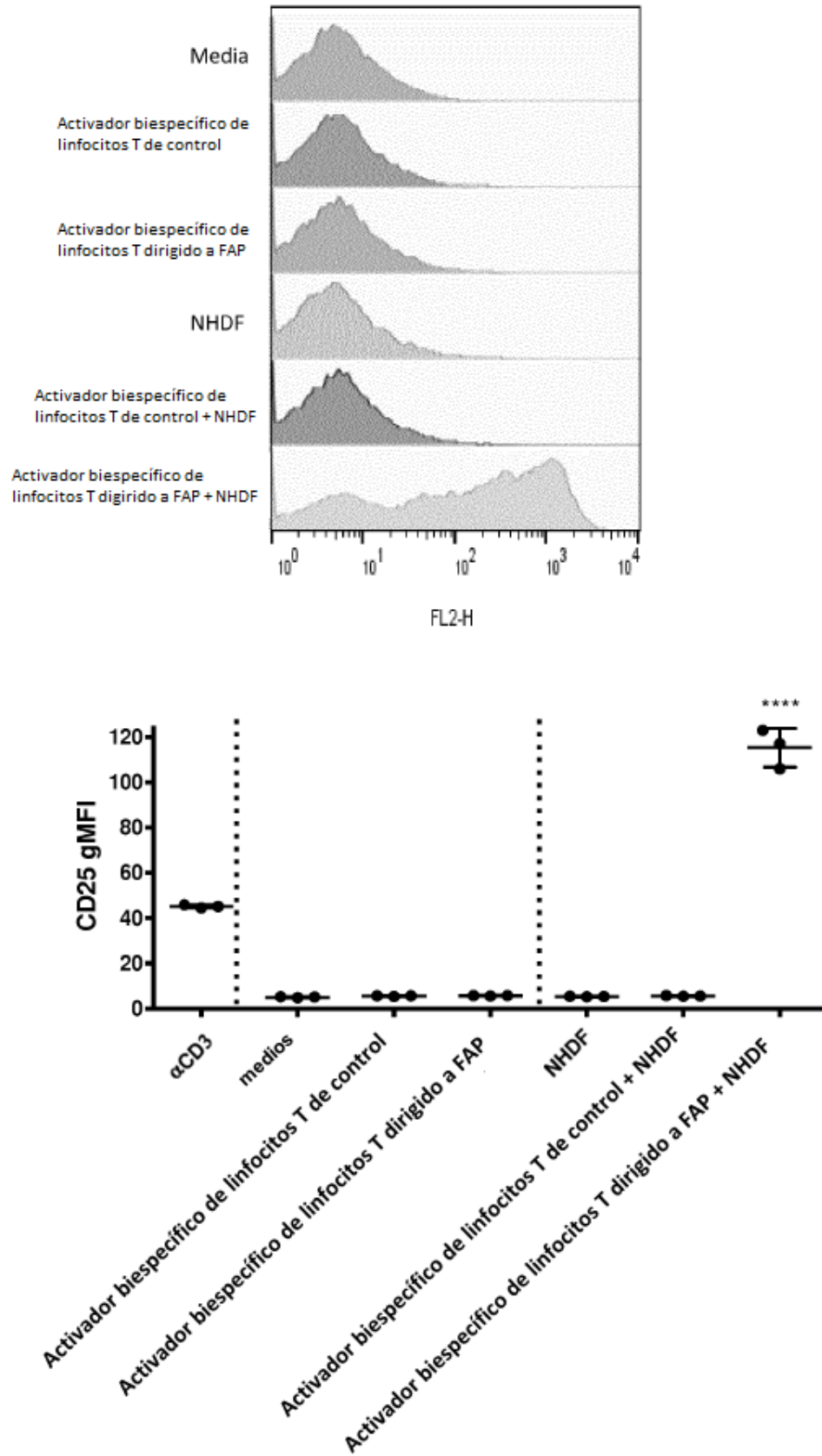
Figura 14B

Figura 14C

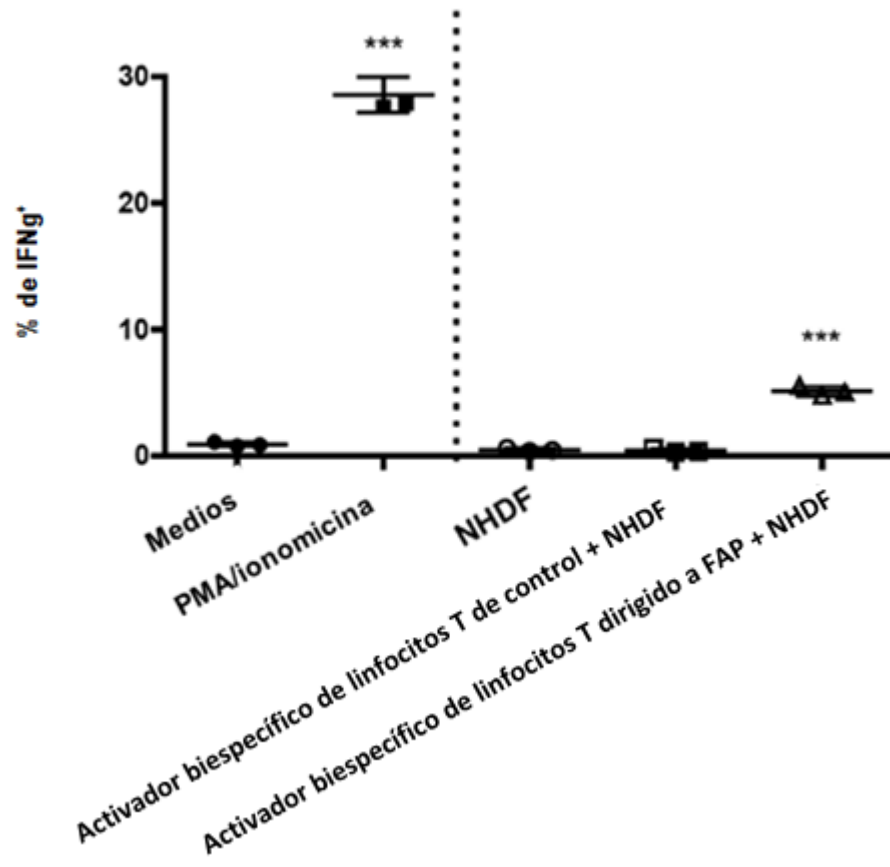


Figura 15

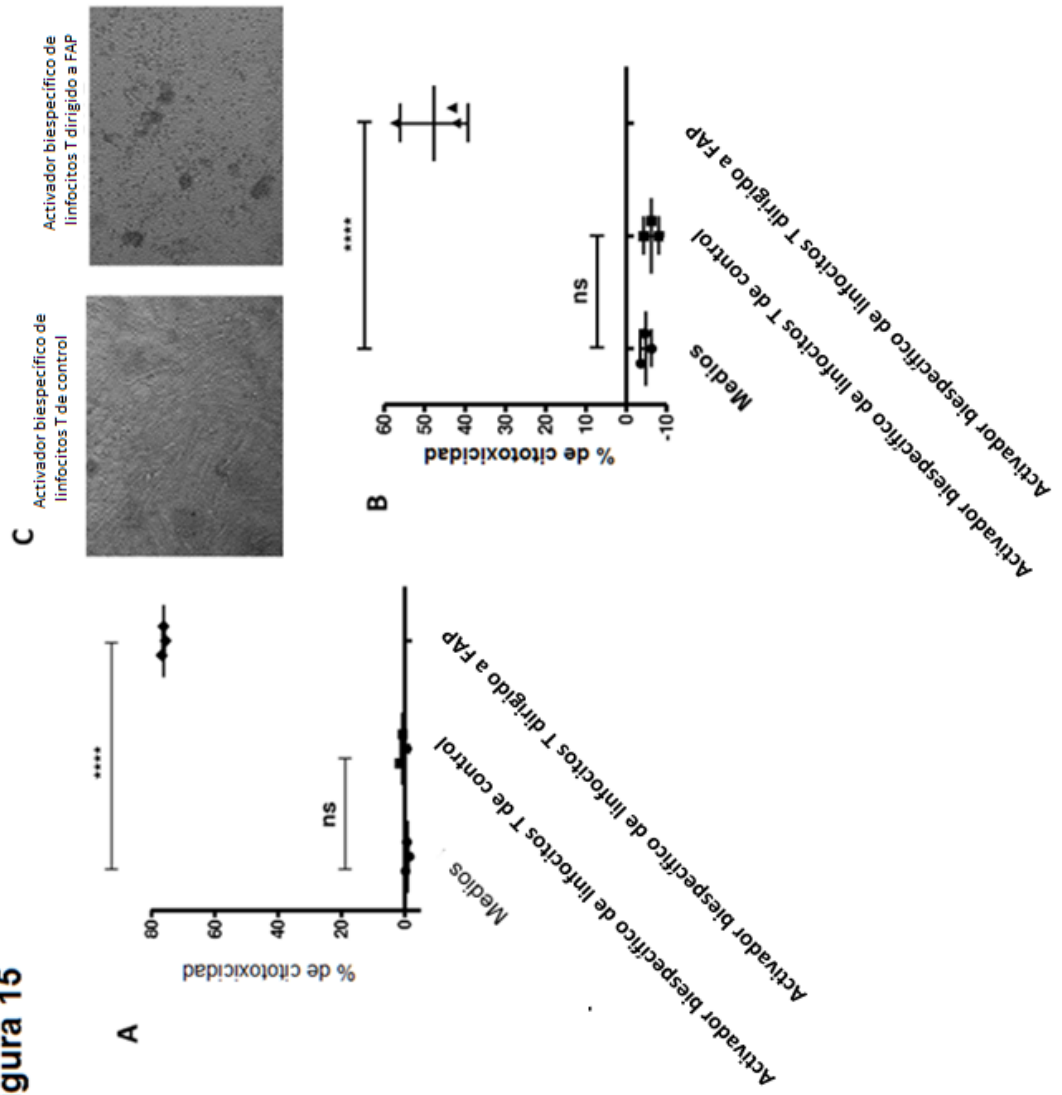


Figura 16

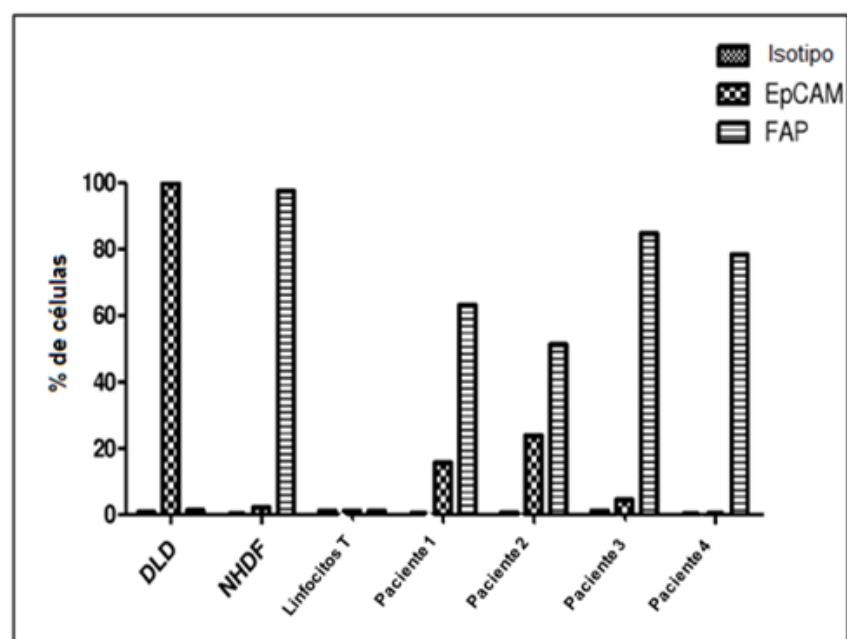
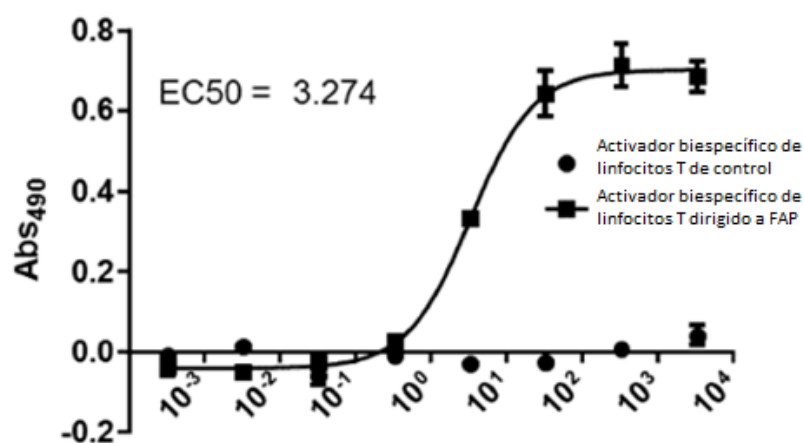


Figura 17A



Concentración de activador biespecífico de linfocitos T dirigido a FAP [ng/ml]

Figura 17B

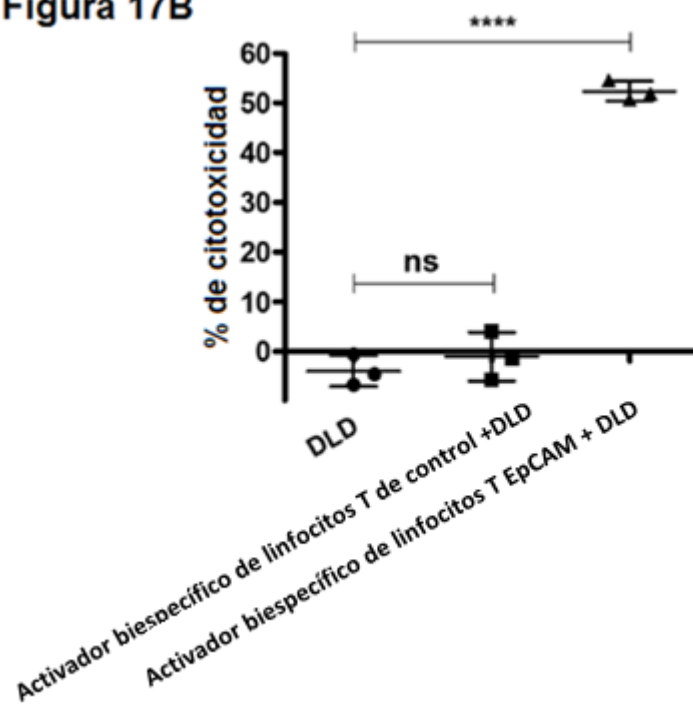
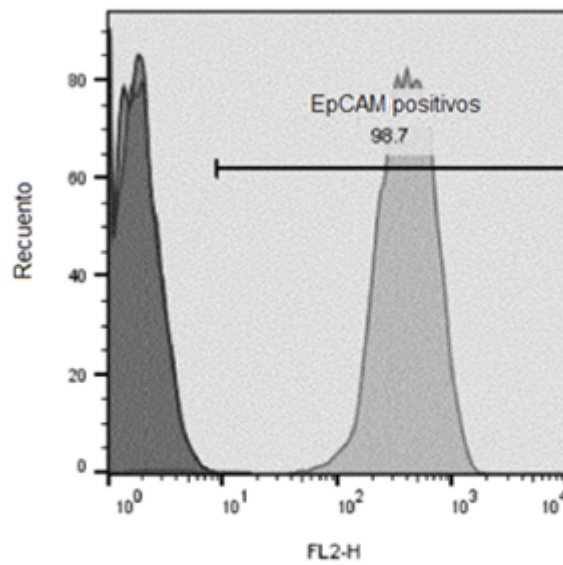


Figura 17C



	Nombre de la muestra	EpCAM positivo :: Frecuencia de parental	Media geométrica :: FL2-H
	[DLD sin tefir .021]	0.40	1.77
	[DLD iso.022]	0.36	1.81
	[DLD ep.023]	98.7	361

Figura 18A

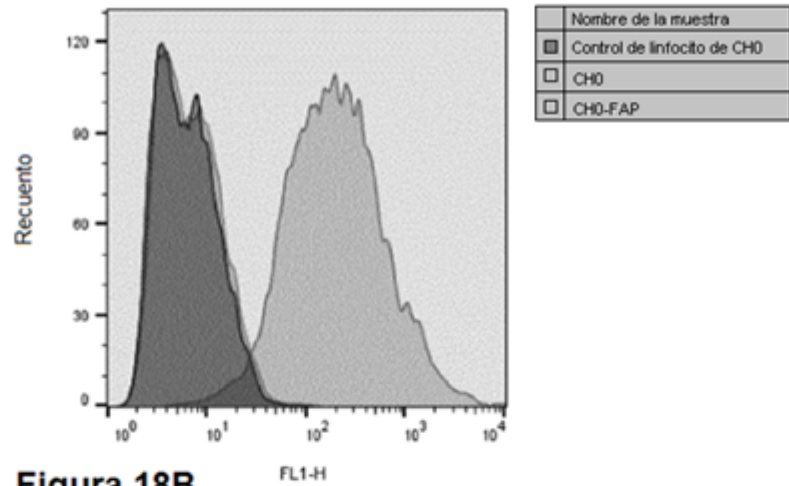


Figura 18B

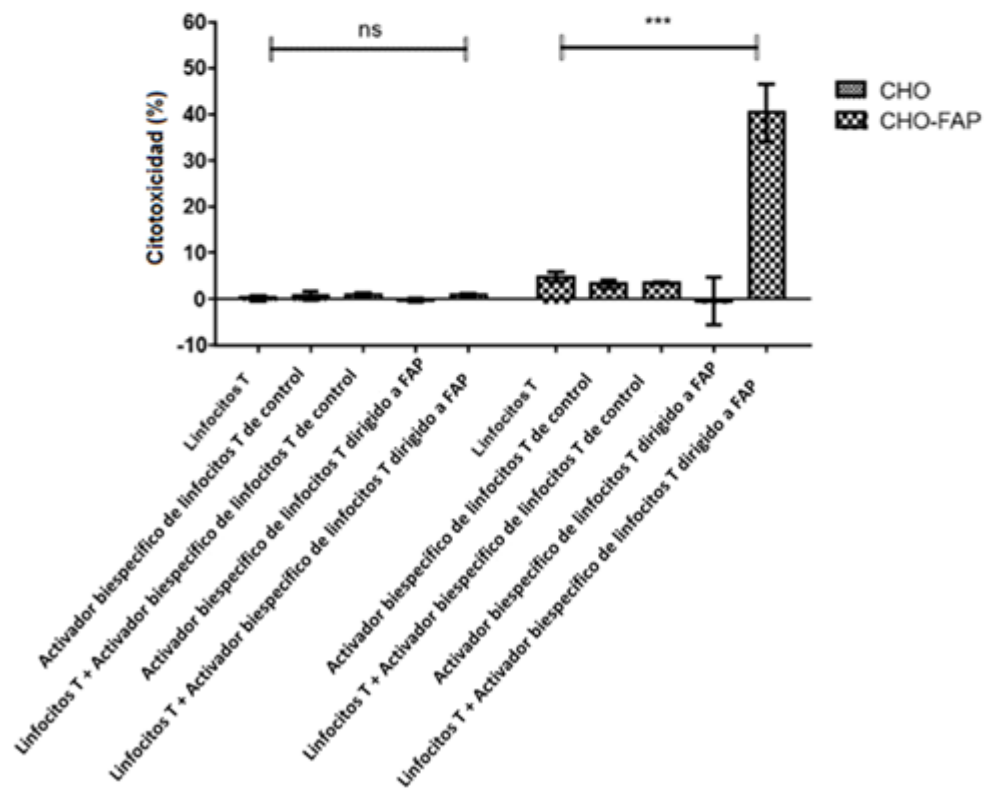


Figura 19

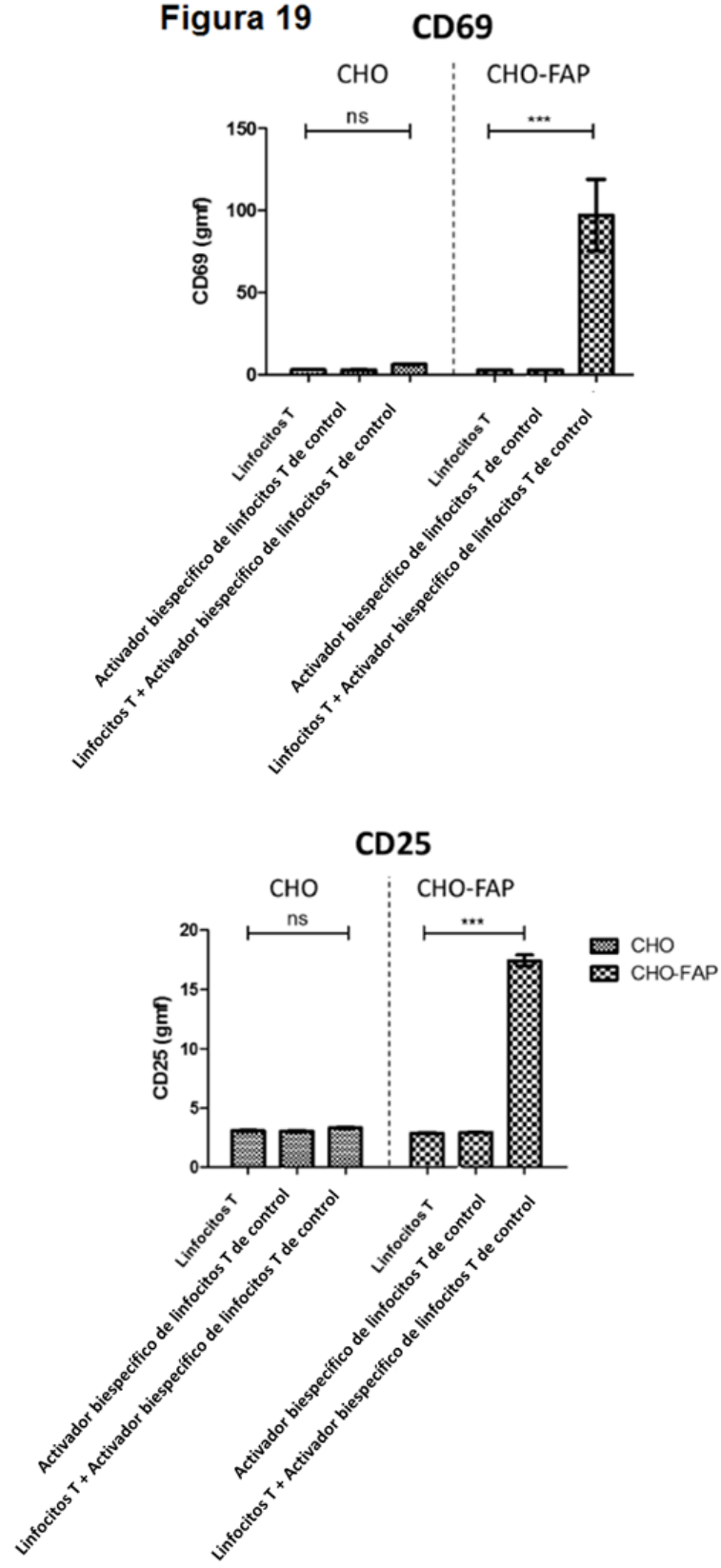


Figura 20

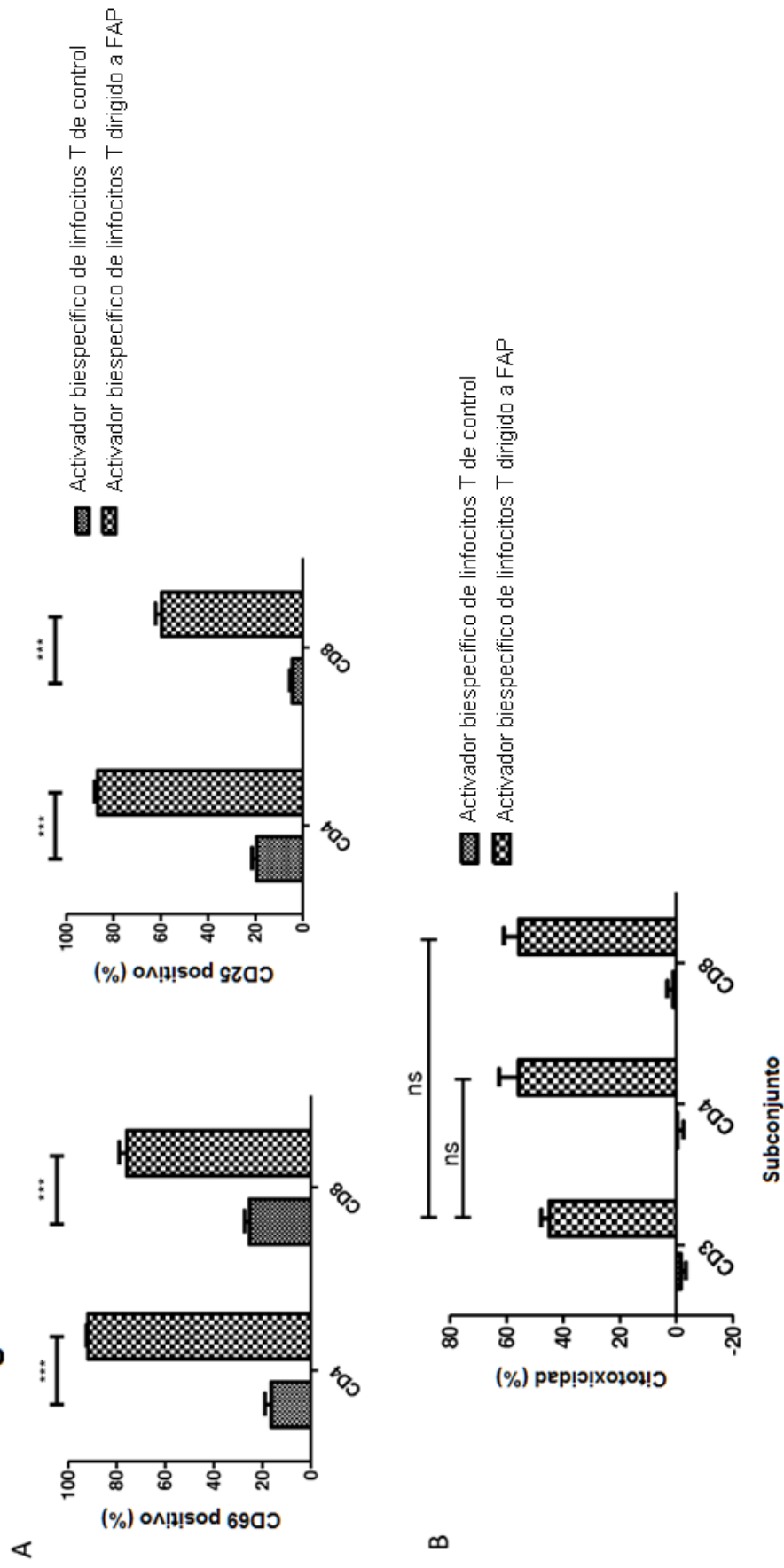


Figura 21

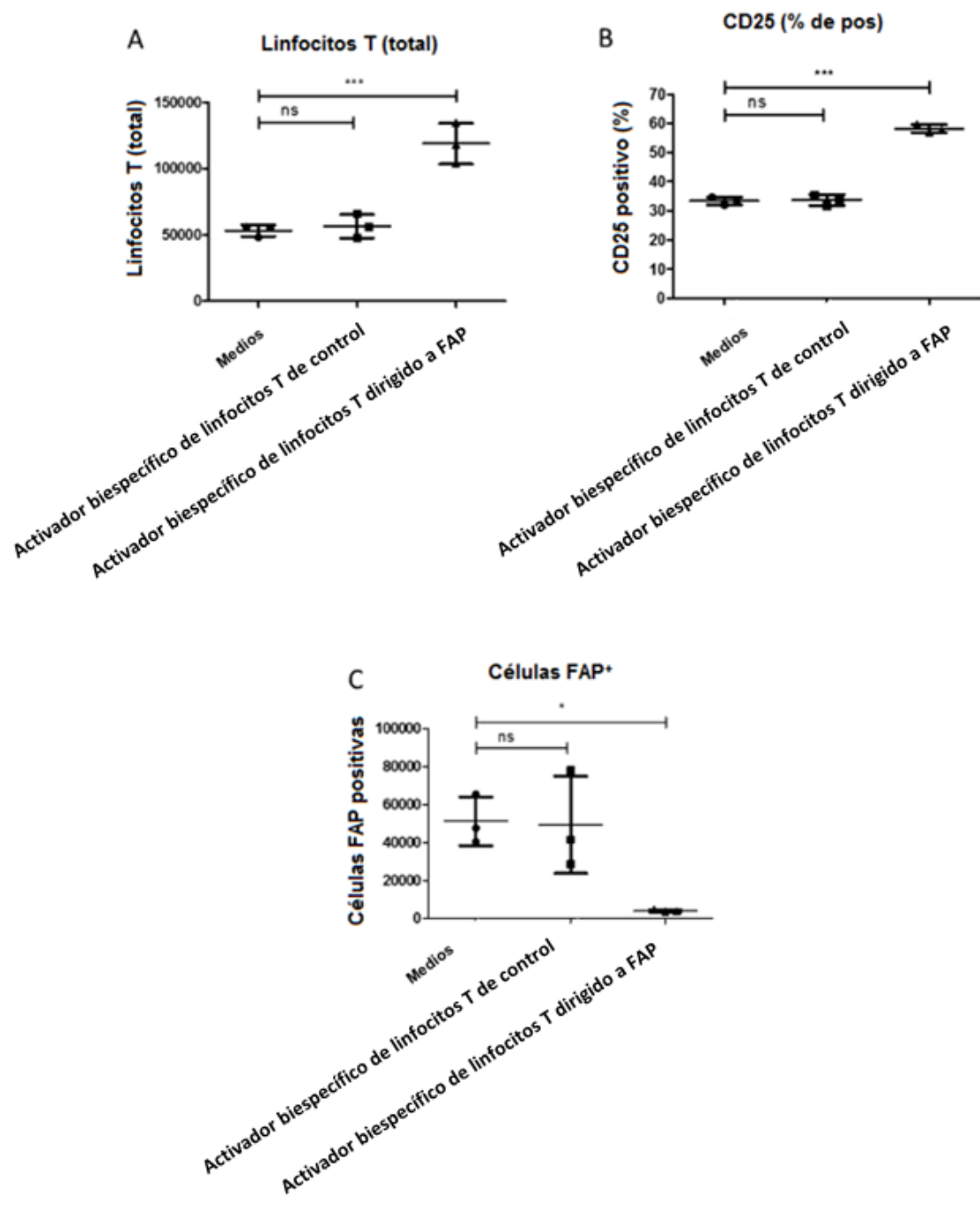


Figura 22

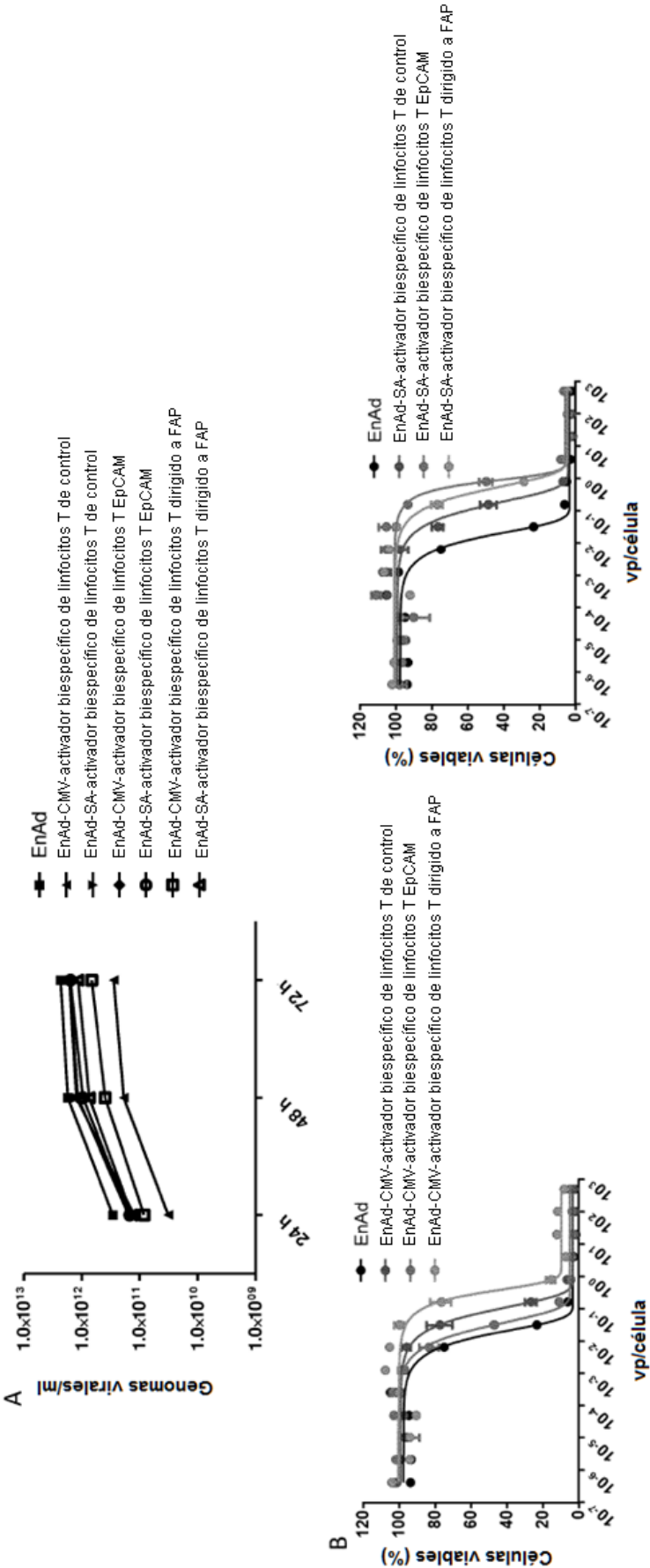


Figura 23A

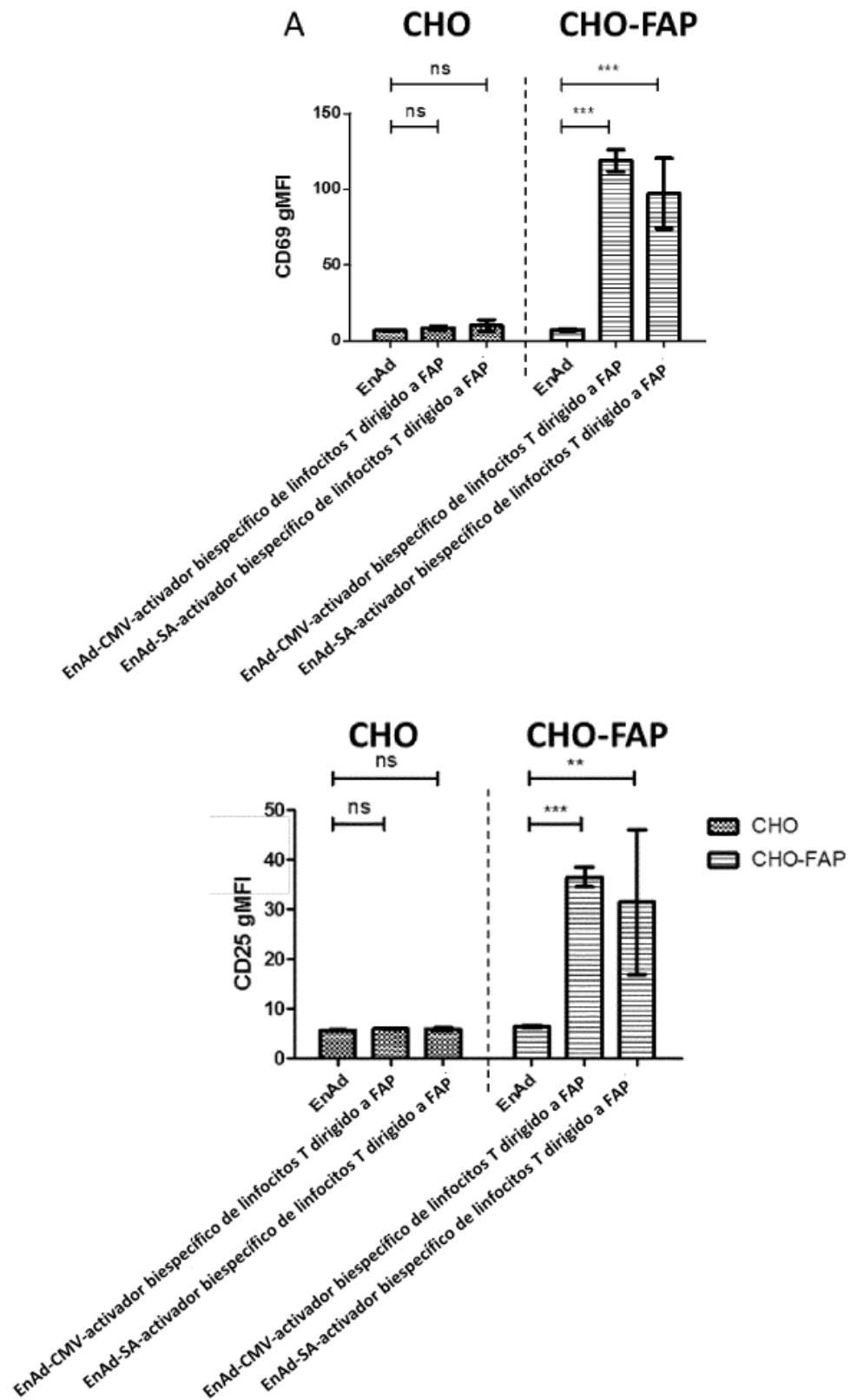


Figura 23B

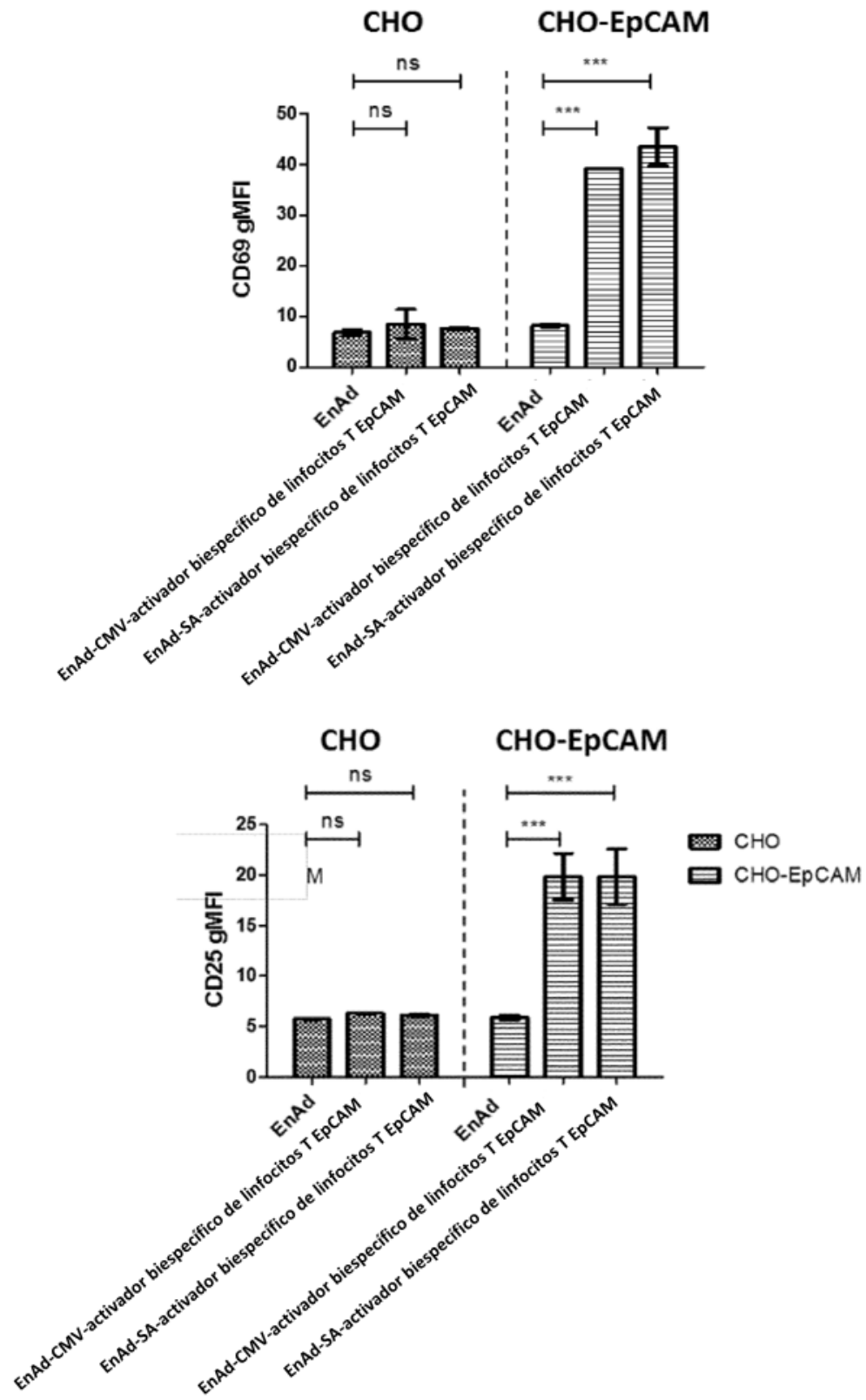


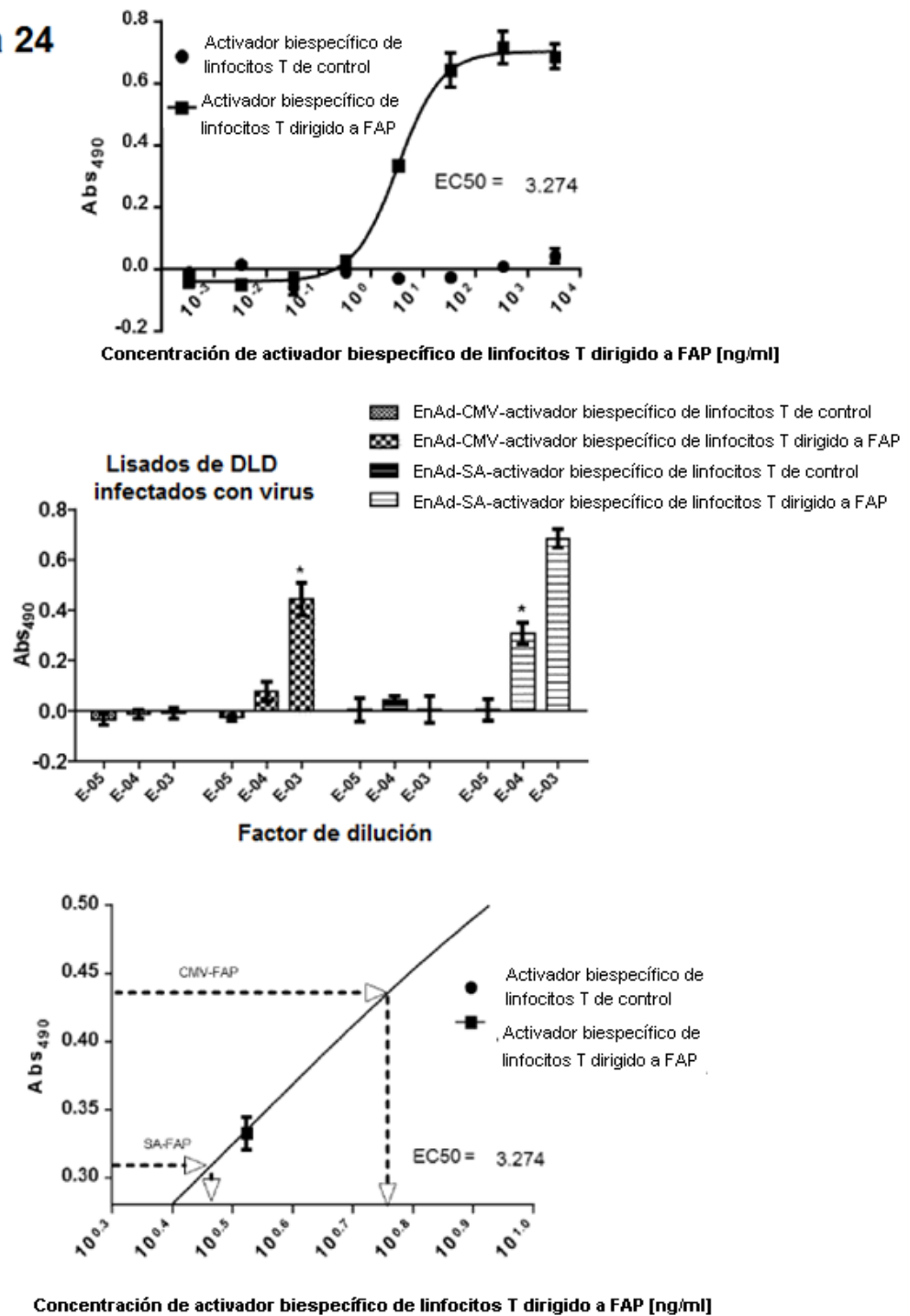
Figura 24

Figura 25

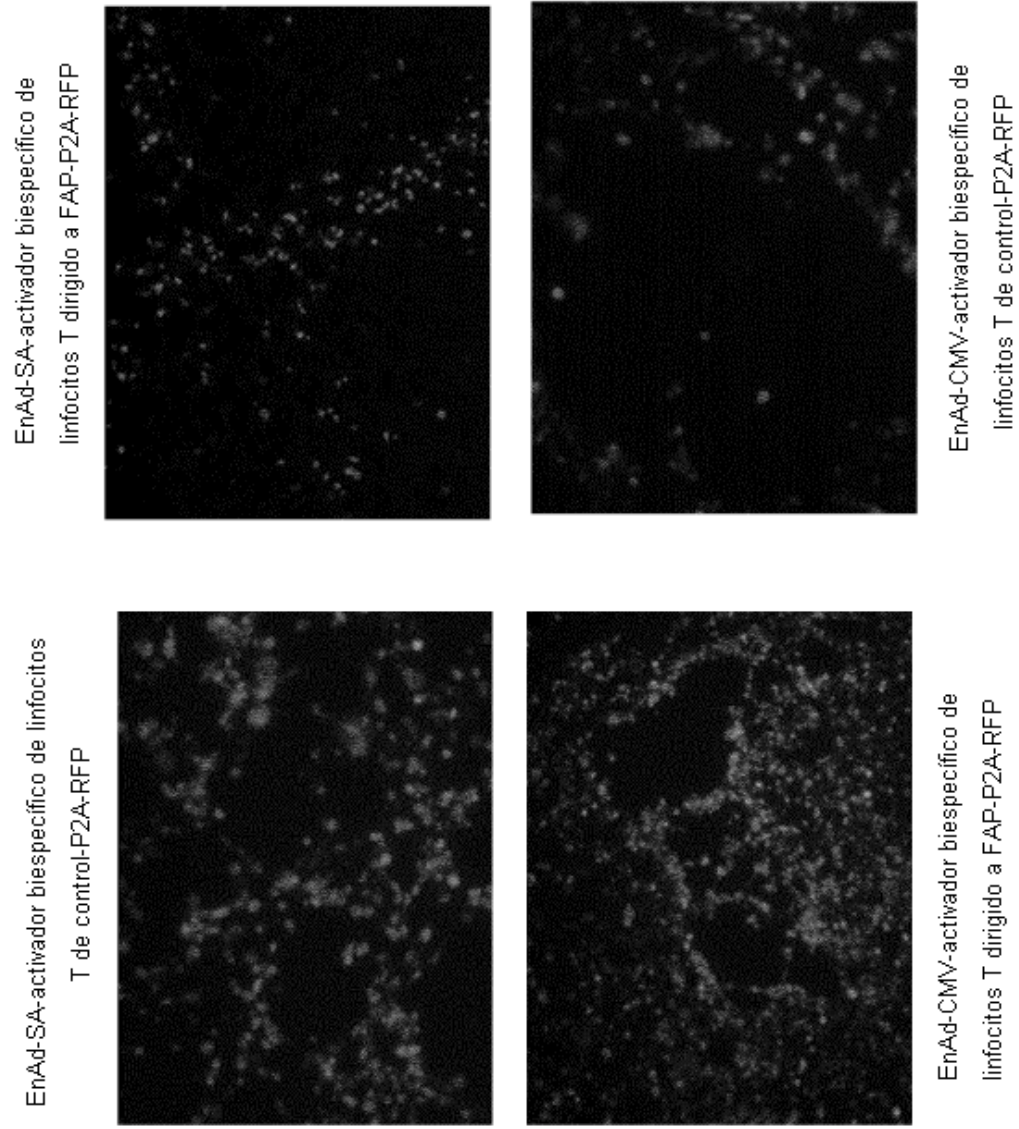


Figura 26A

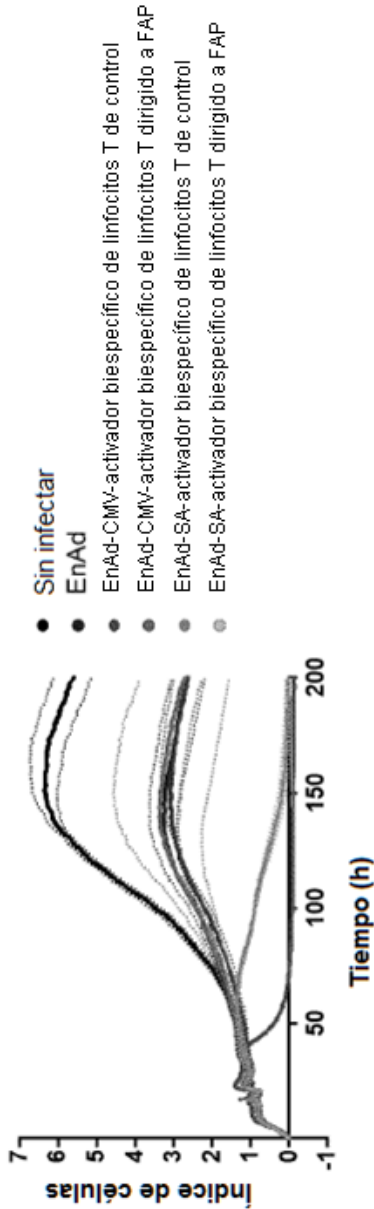


Figura 26B

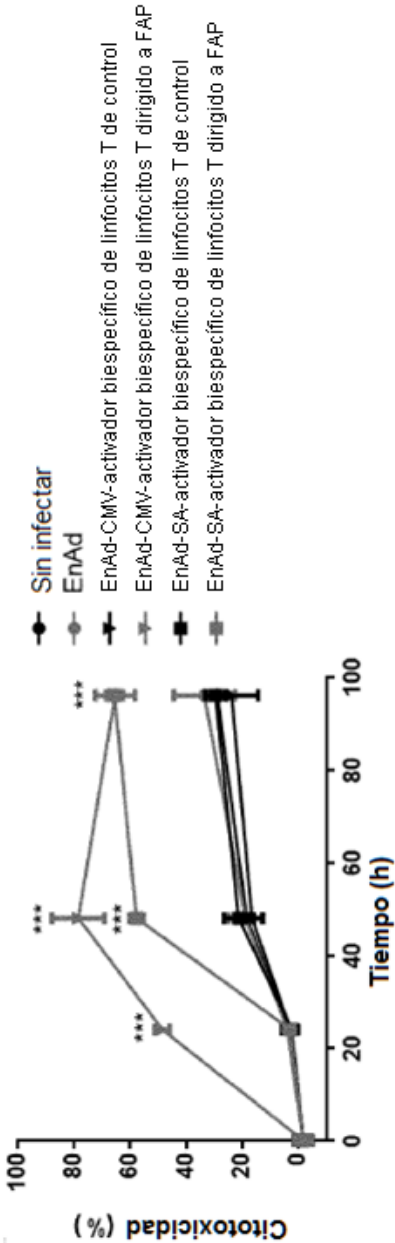


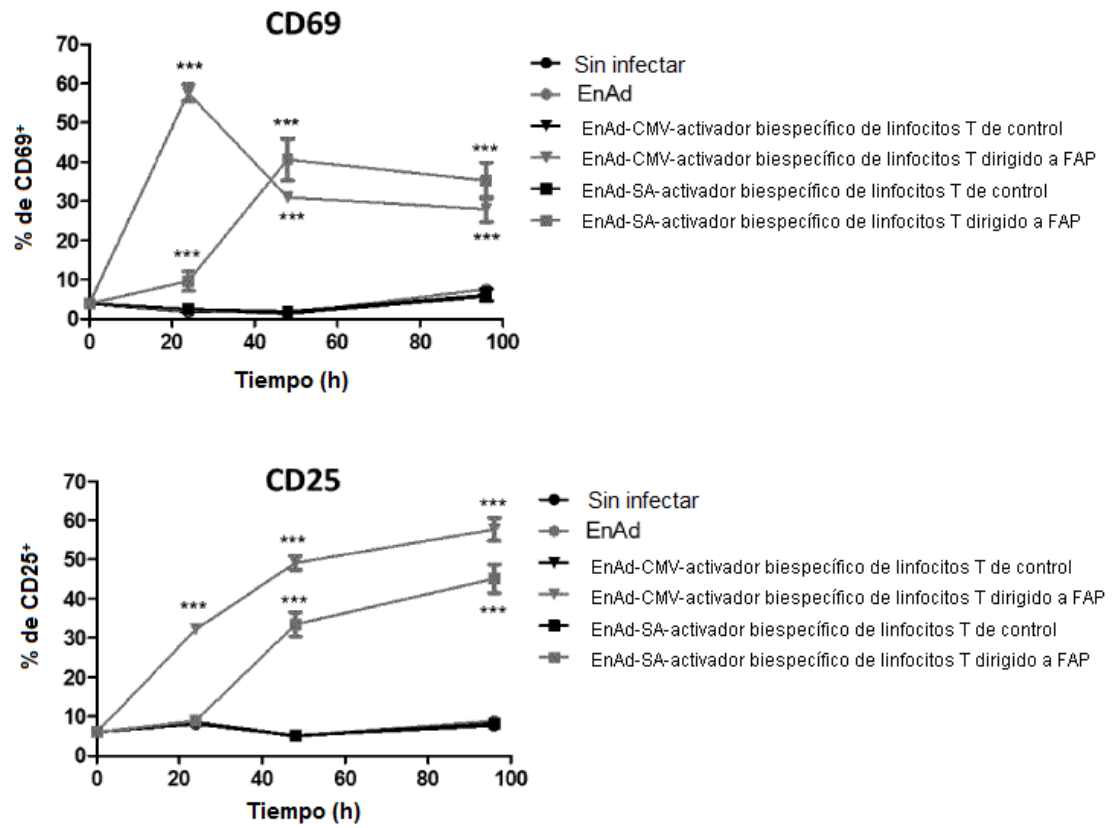
Figura 27

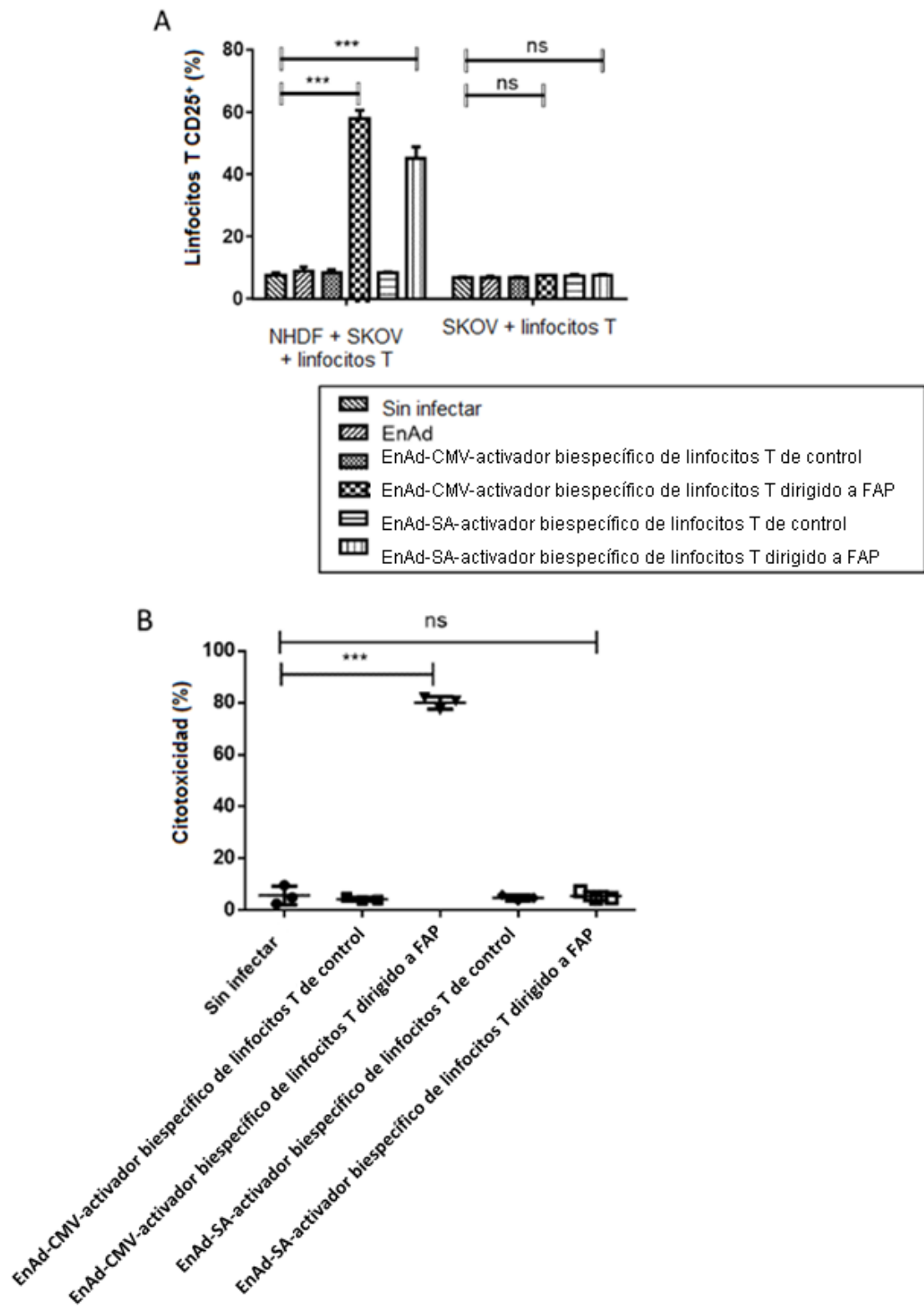
Figura 28

Figura 29

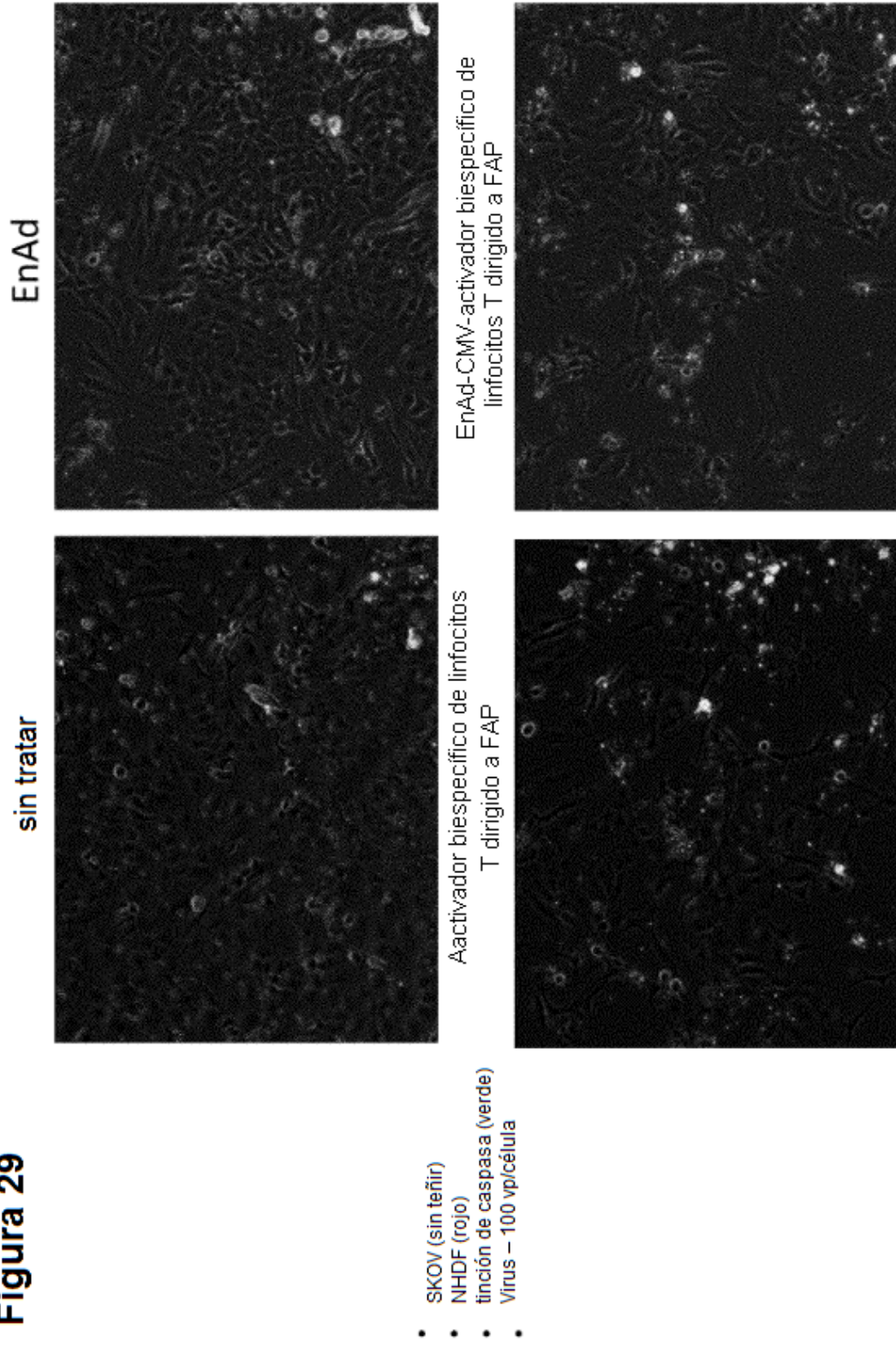


Figura 30

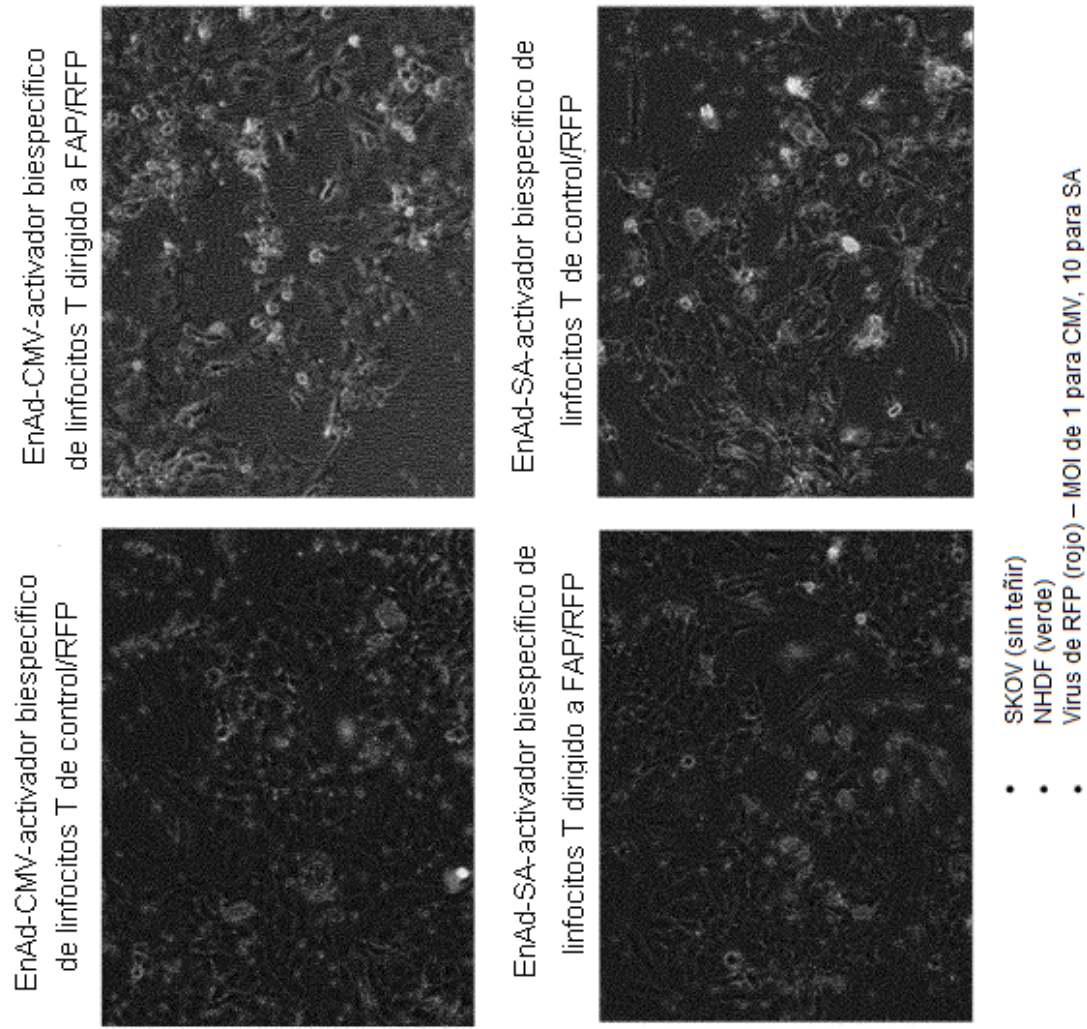


Figura 31

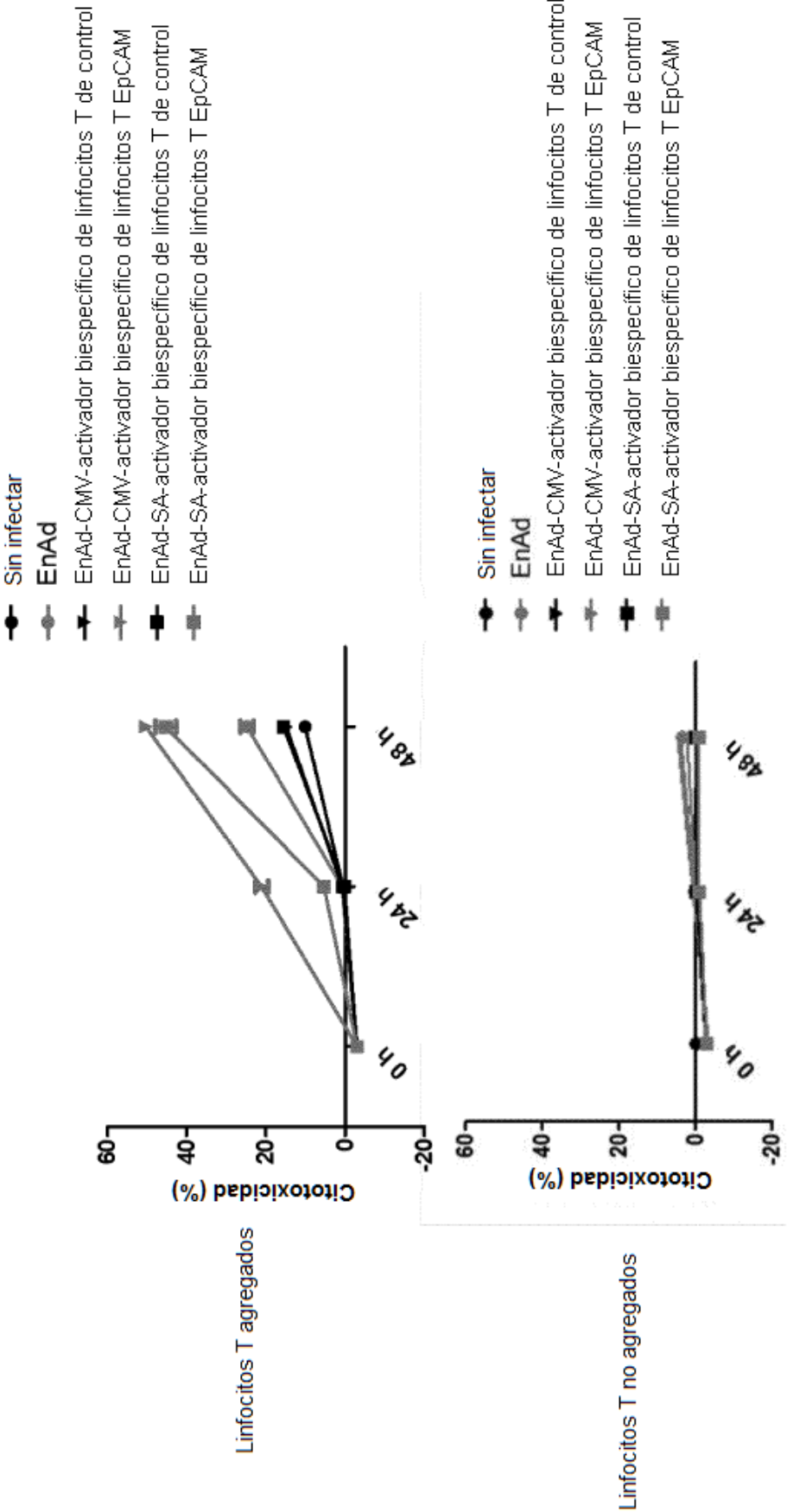


Figura 32

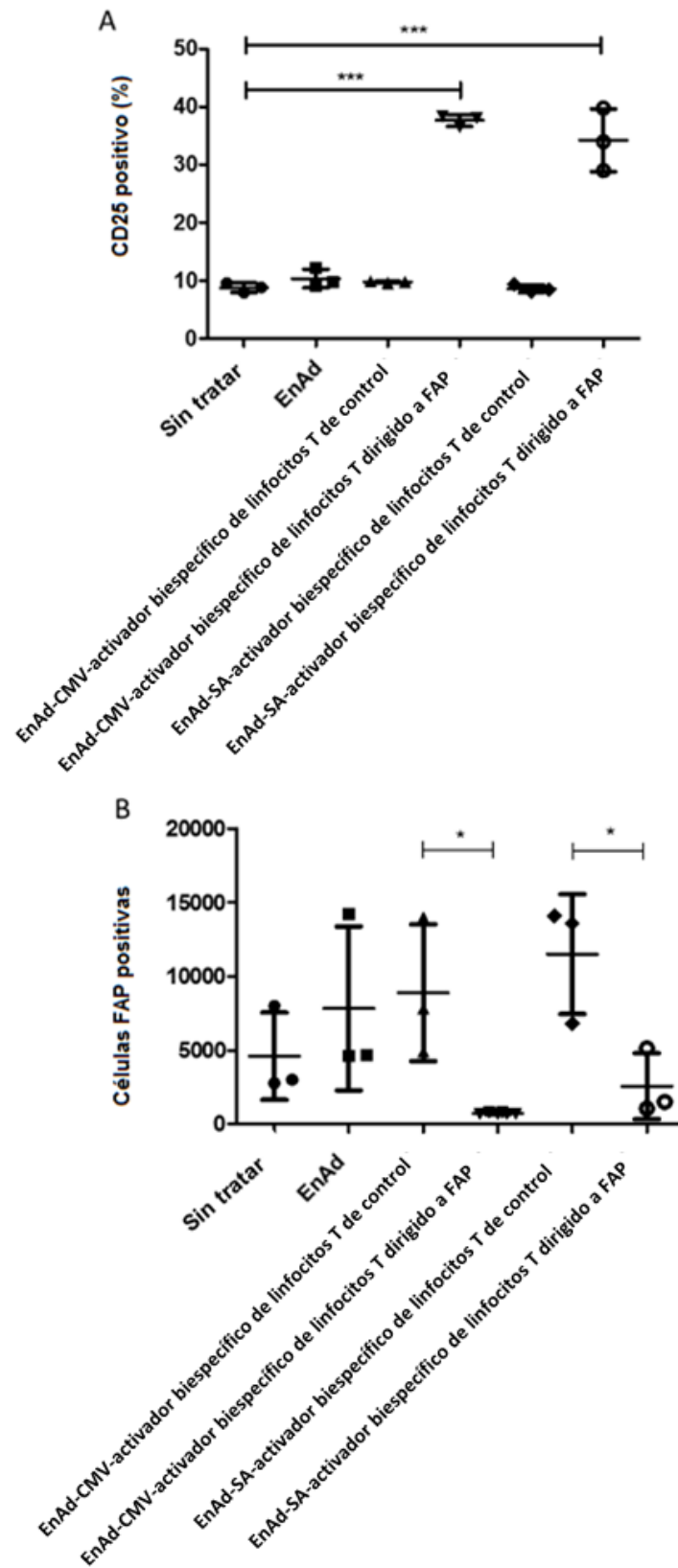
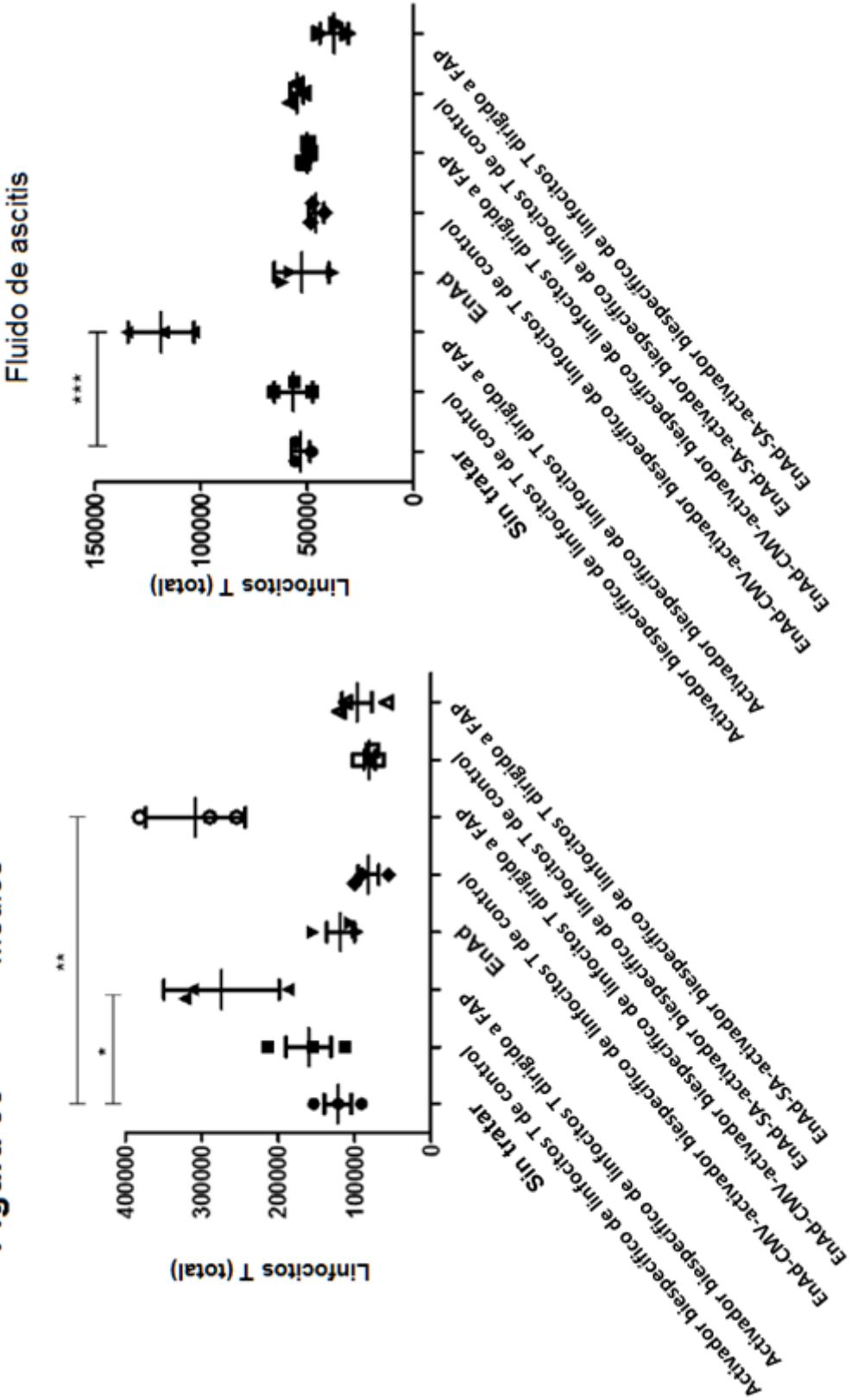


Figura 33 Medios



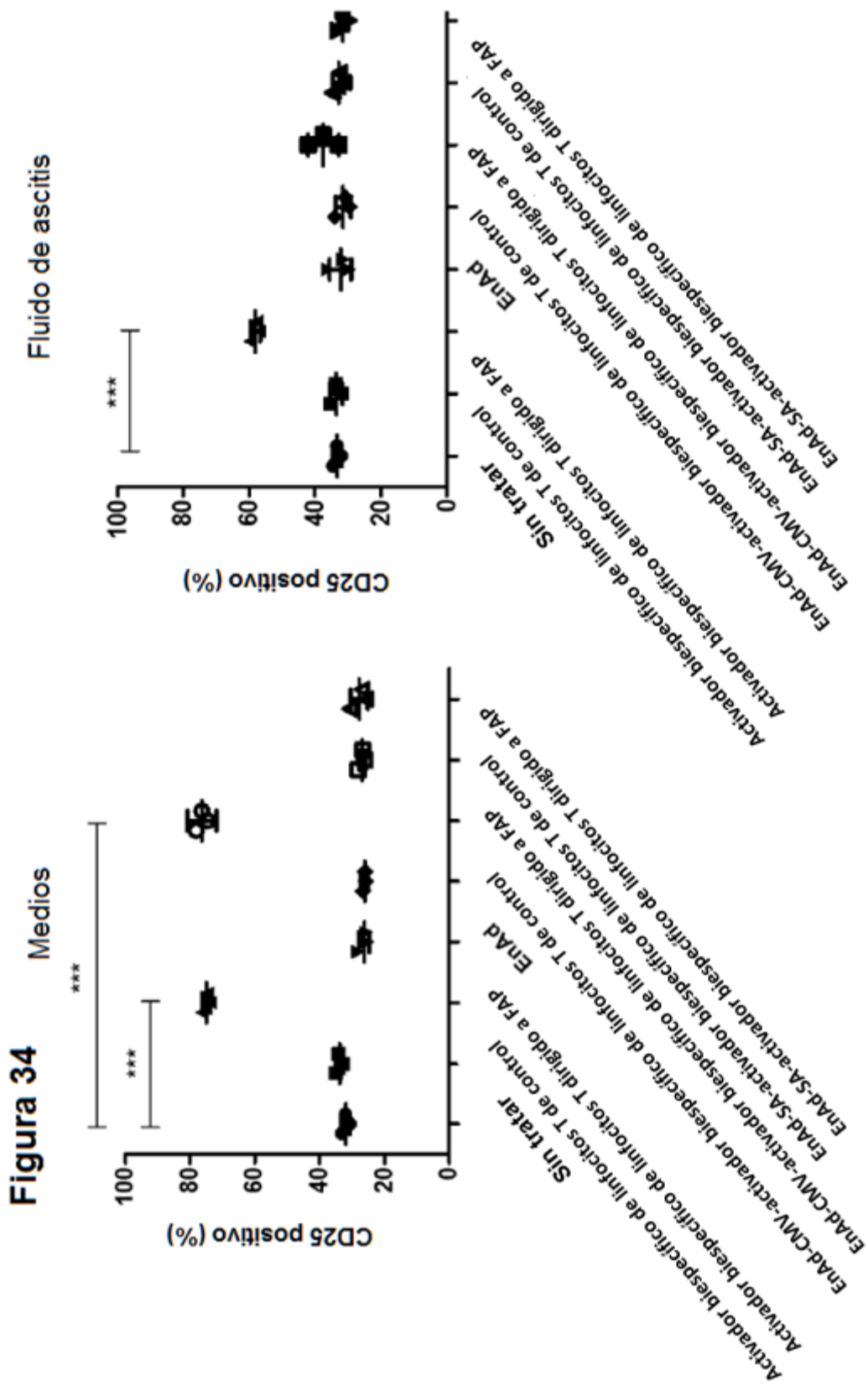
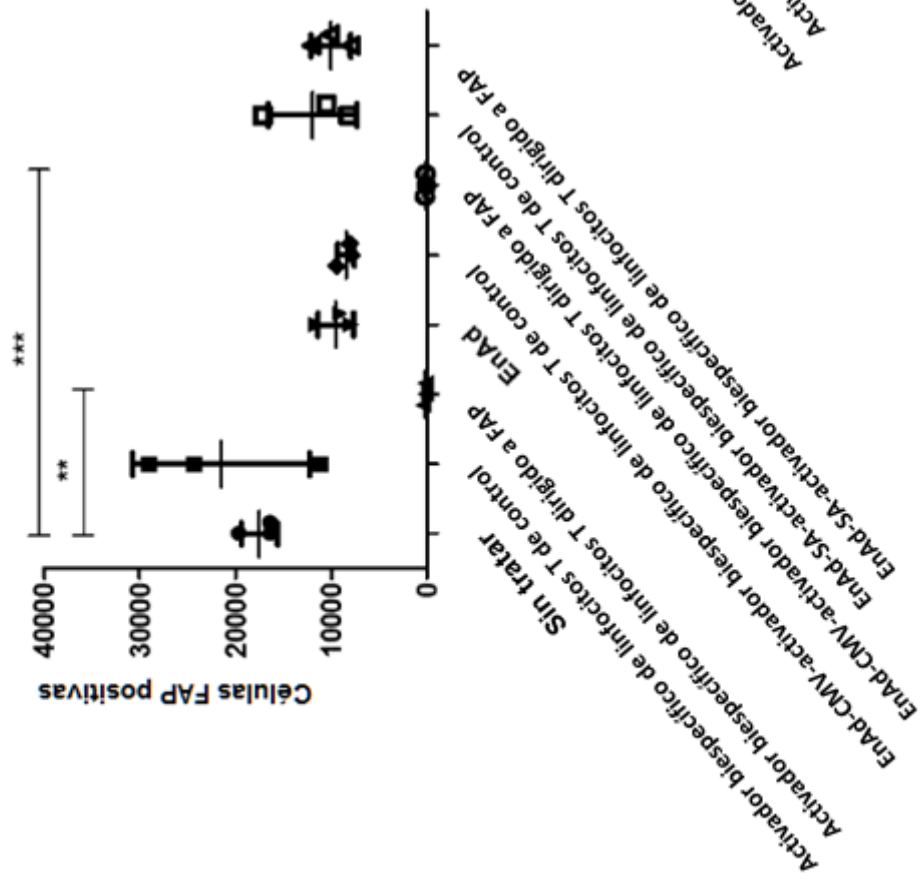


Figura 35



Fluido de ascitis

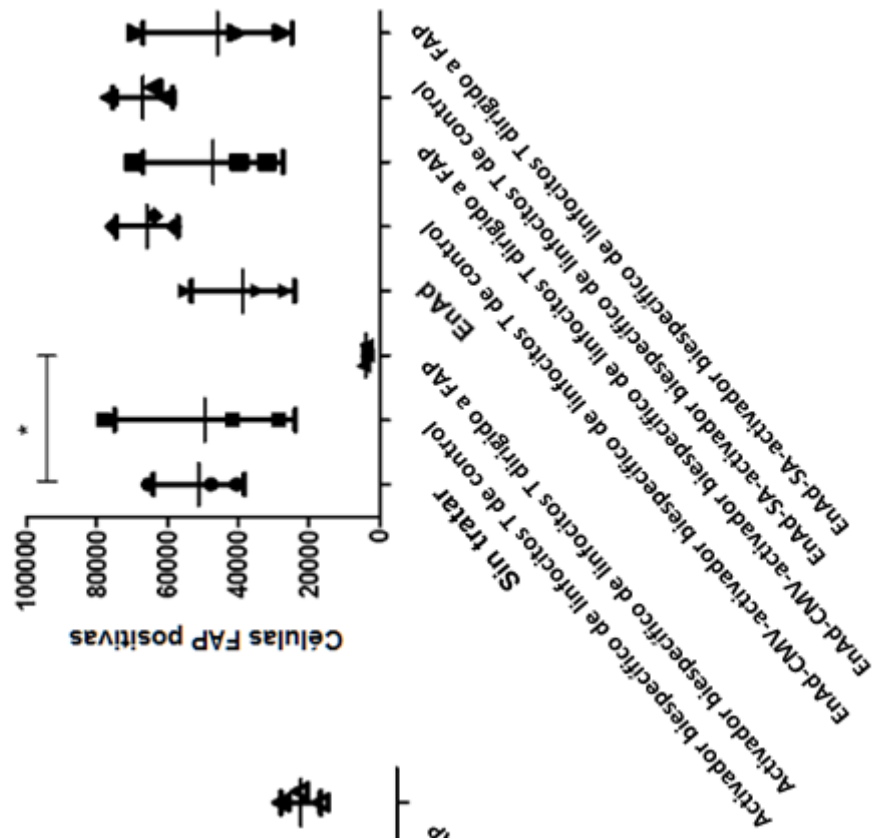


Figura 36

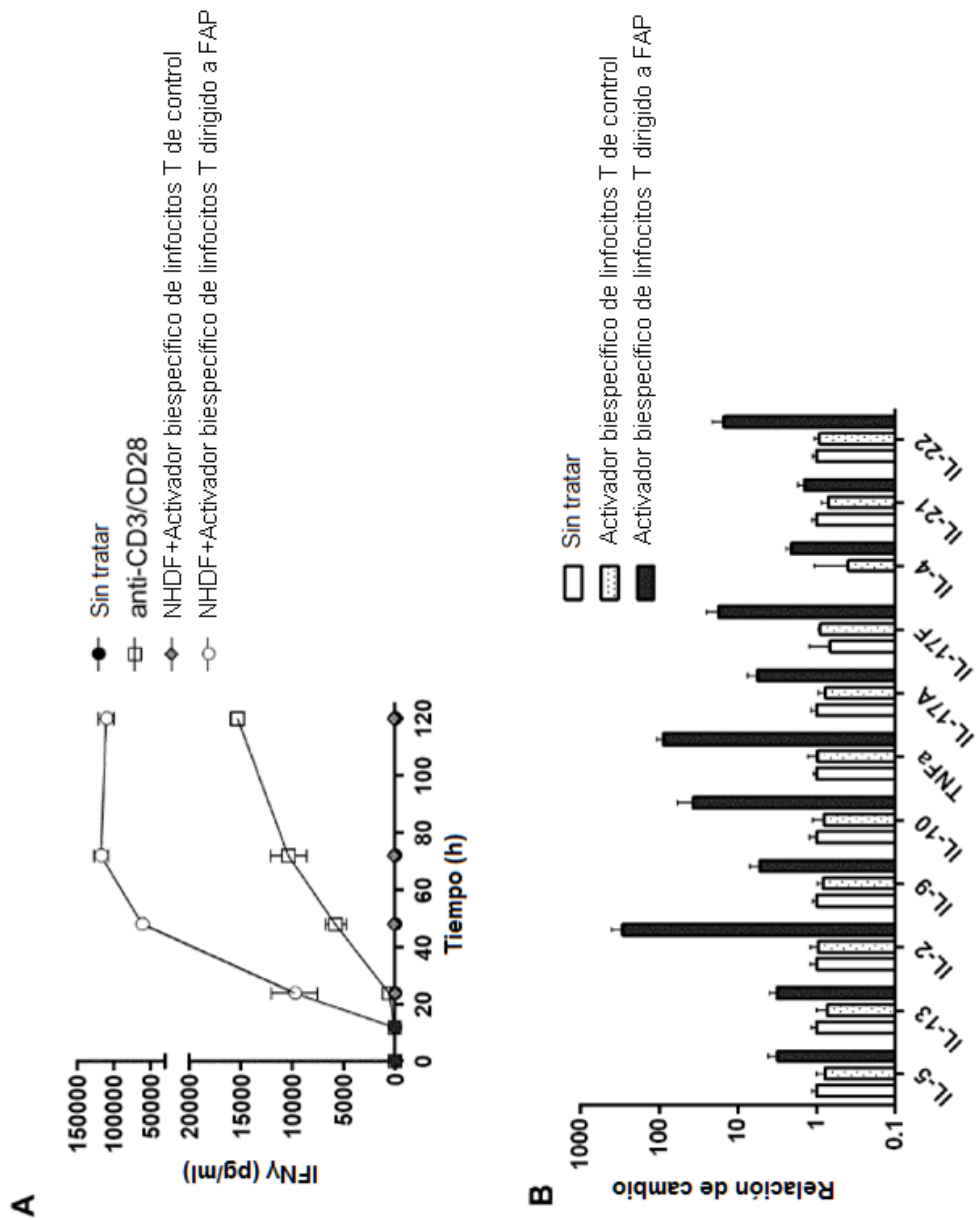


Figura 37

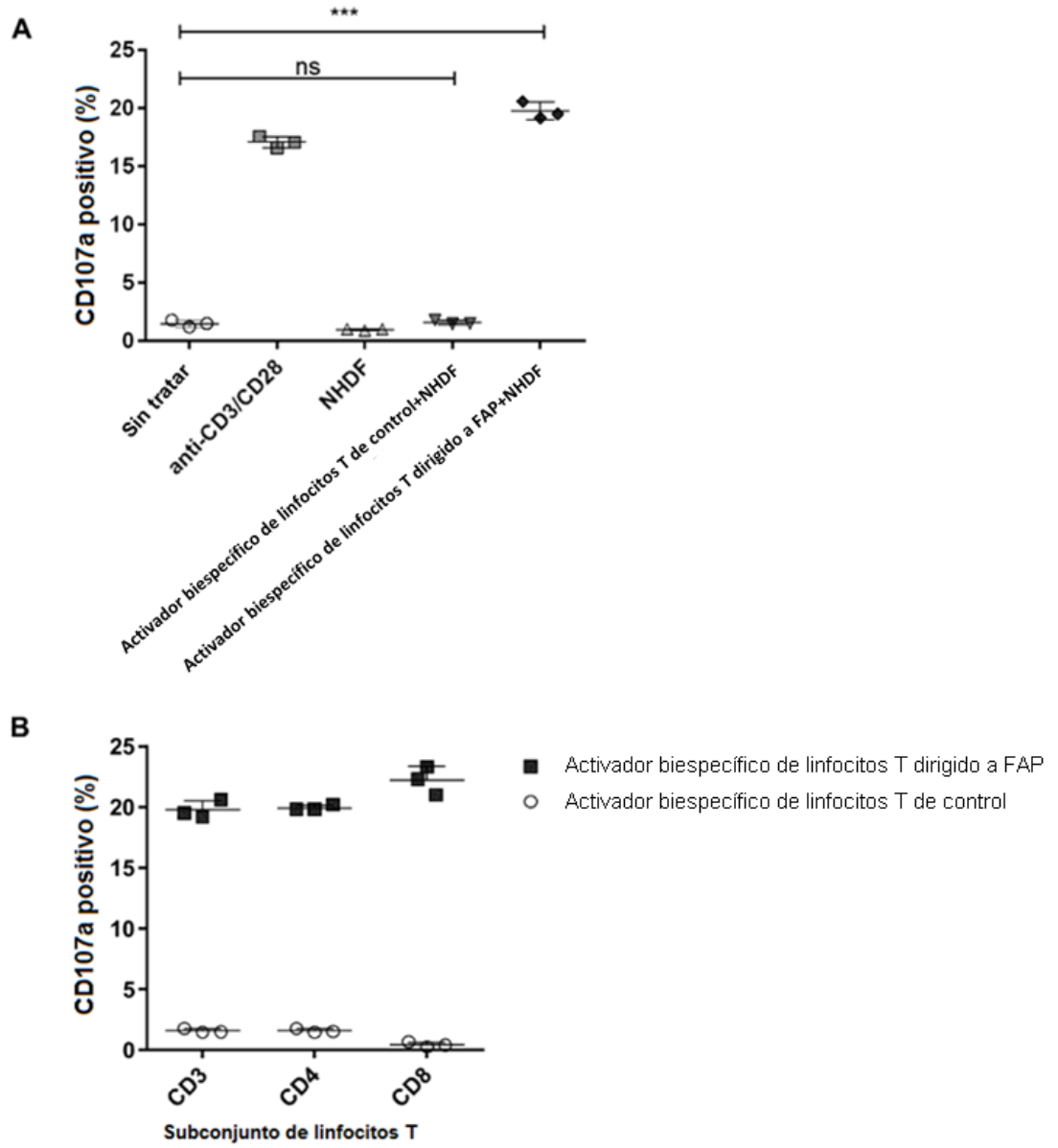


Figura 37 cont.

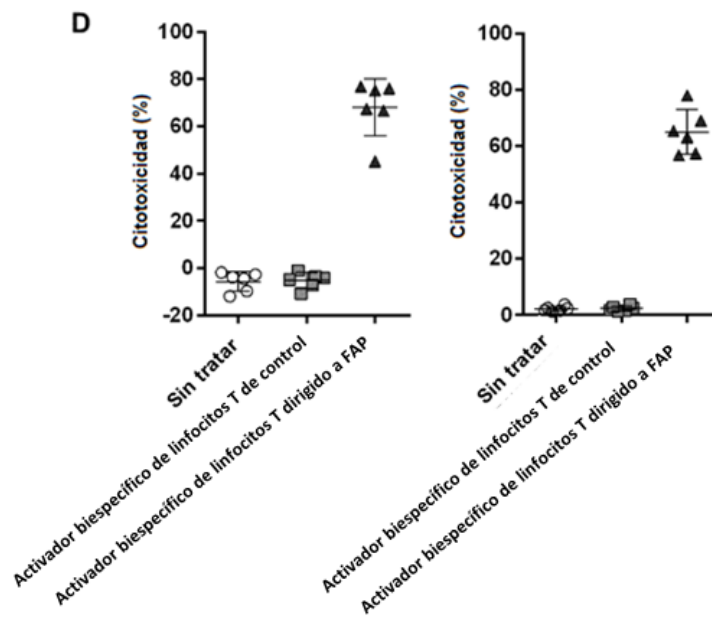
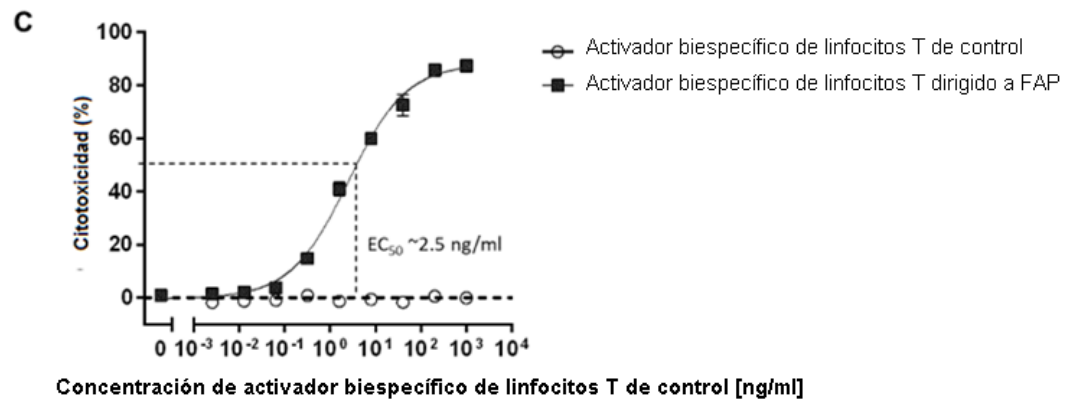


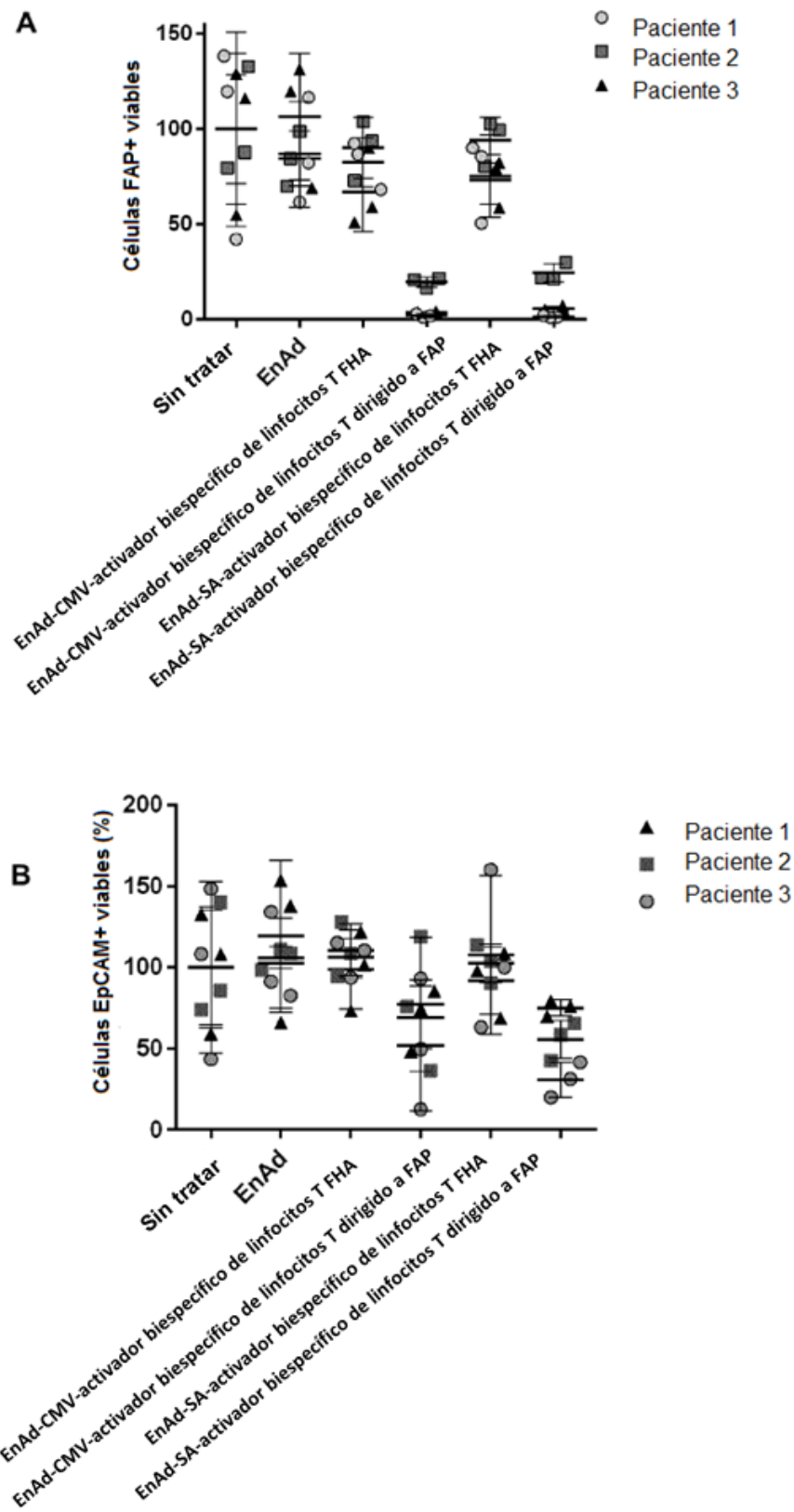
Figura 38

Figura 38 Cont.

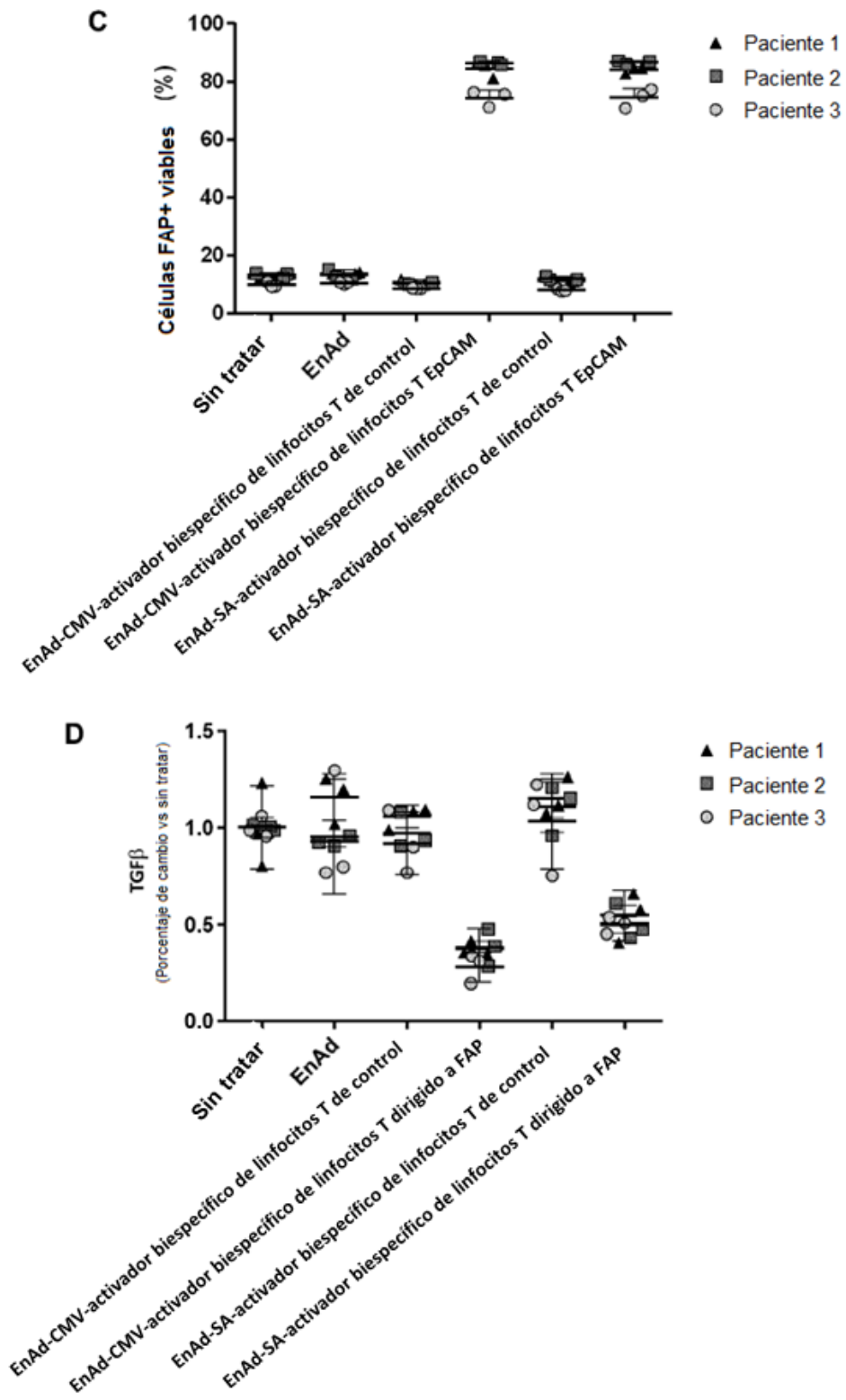


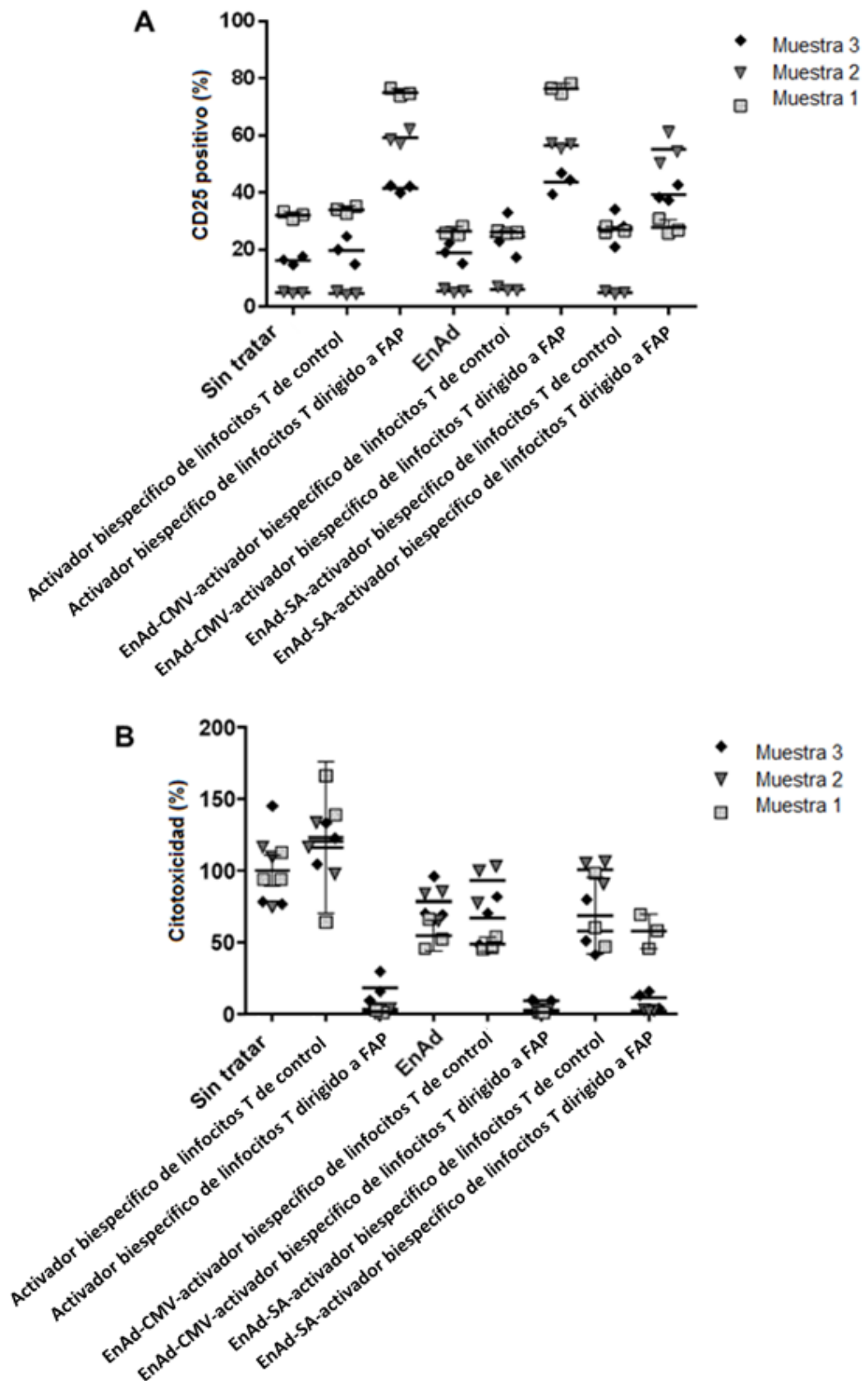
Figura 39

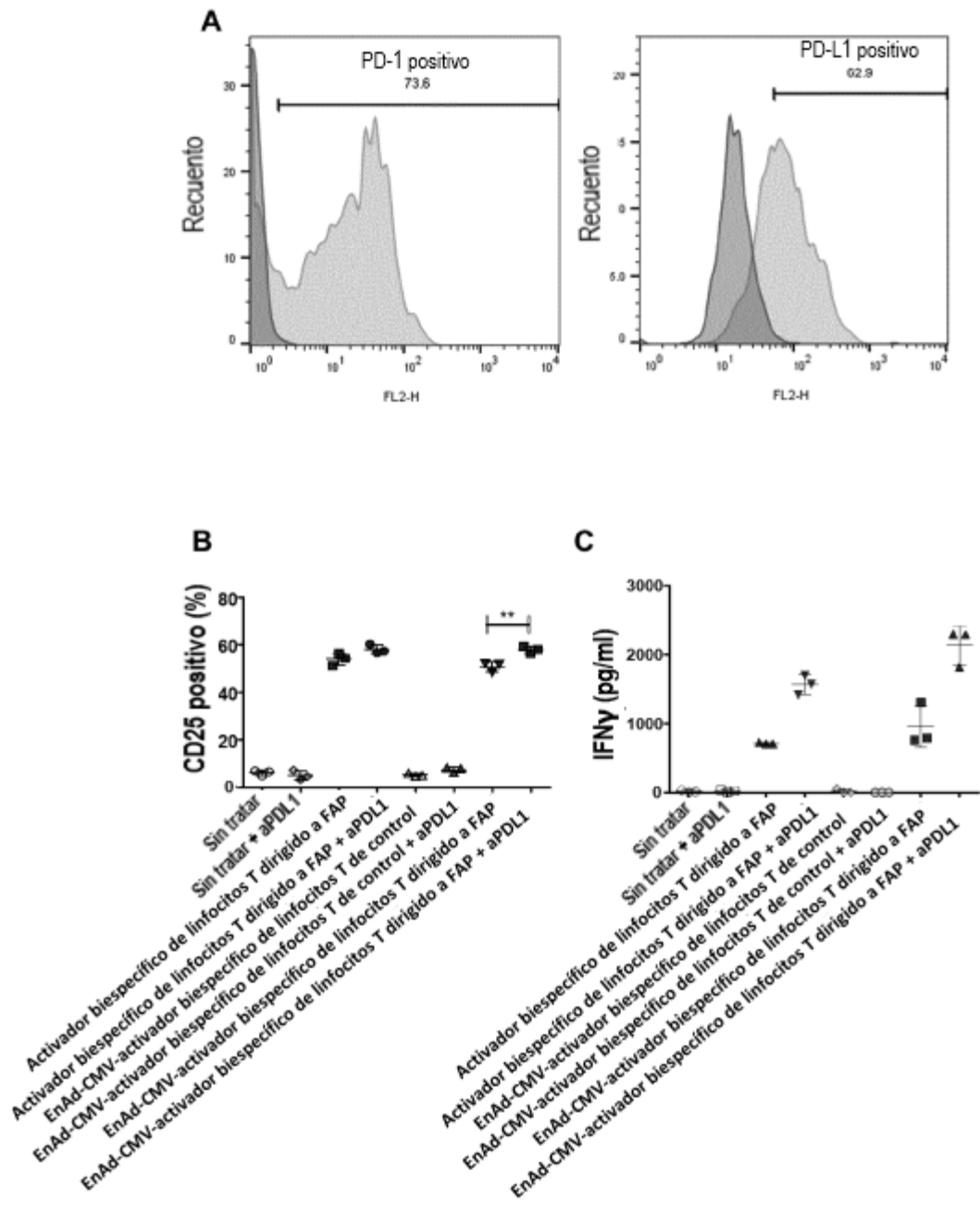
Figura 40

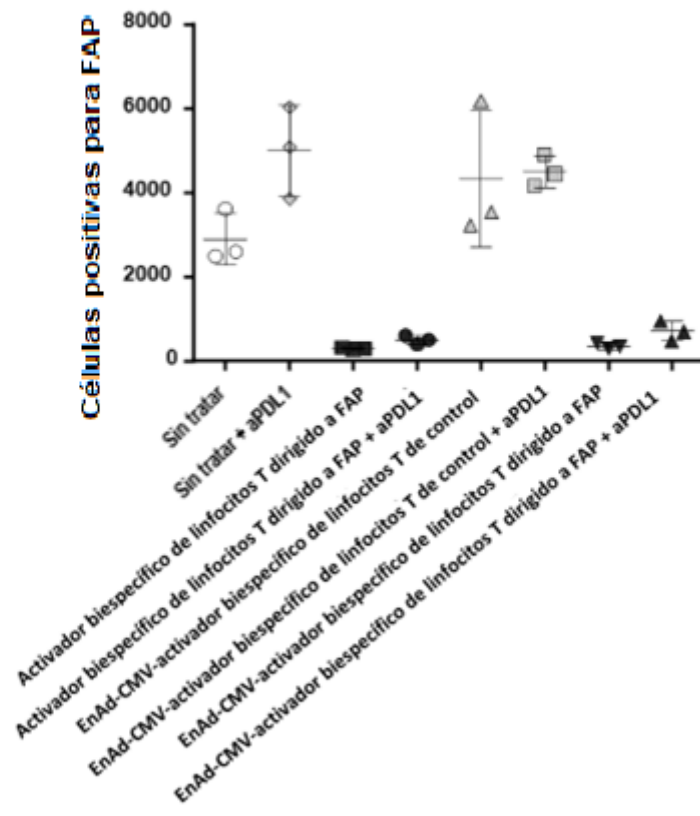
Figura 40 cont.**D**

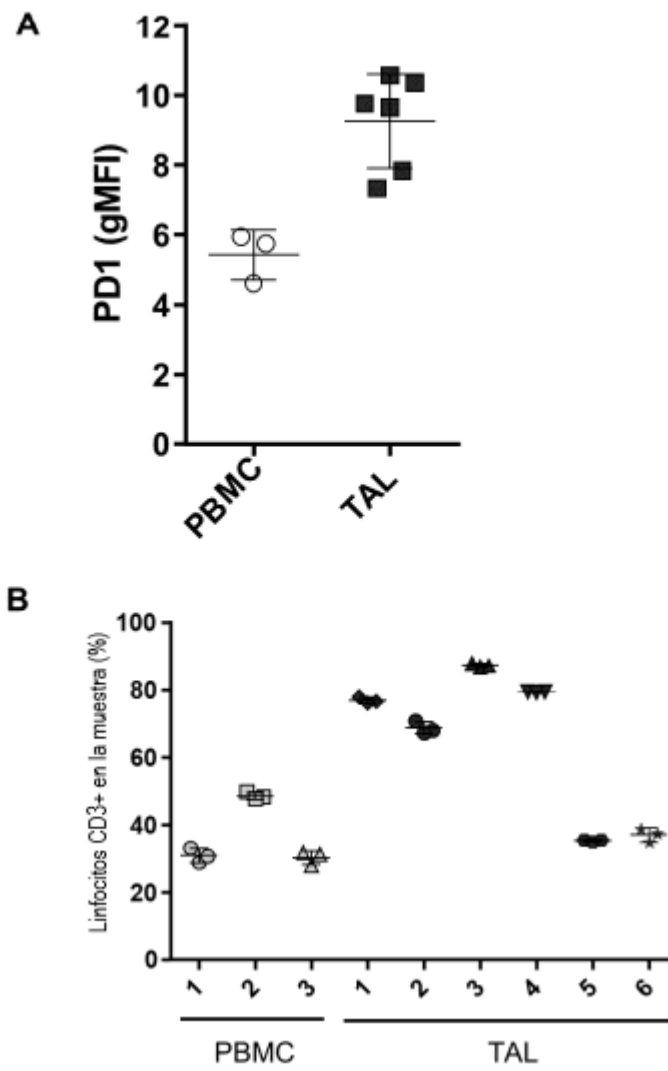
Figura 41

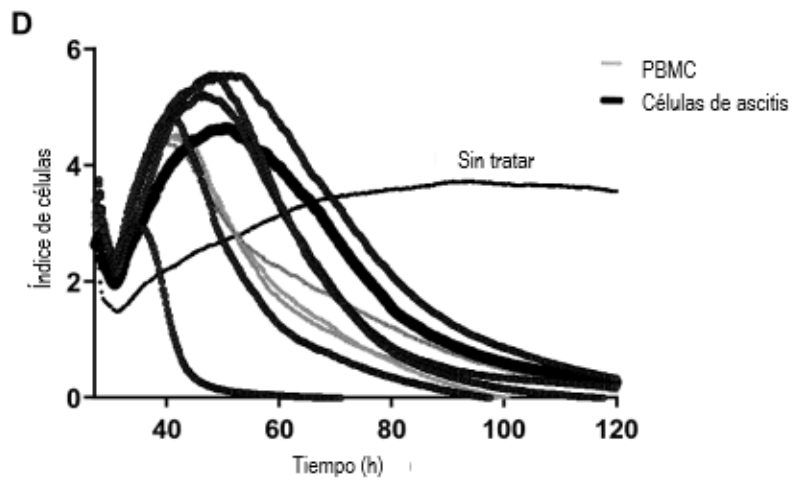
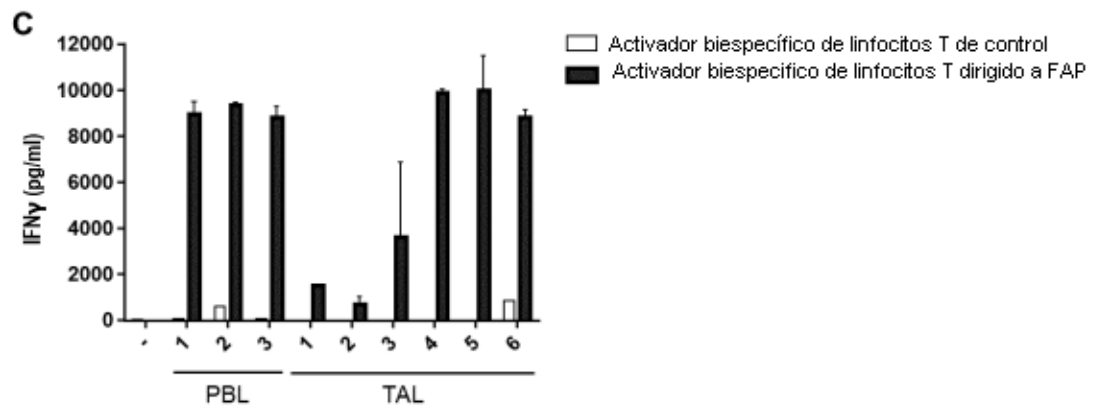
Figura 41 cont.

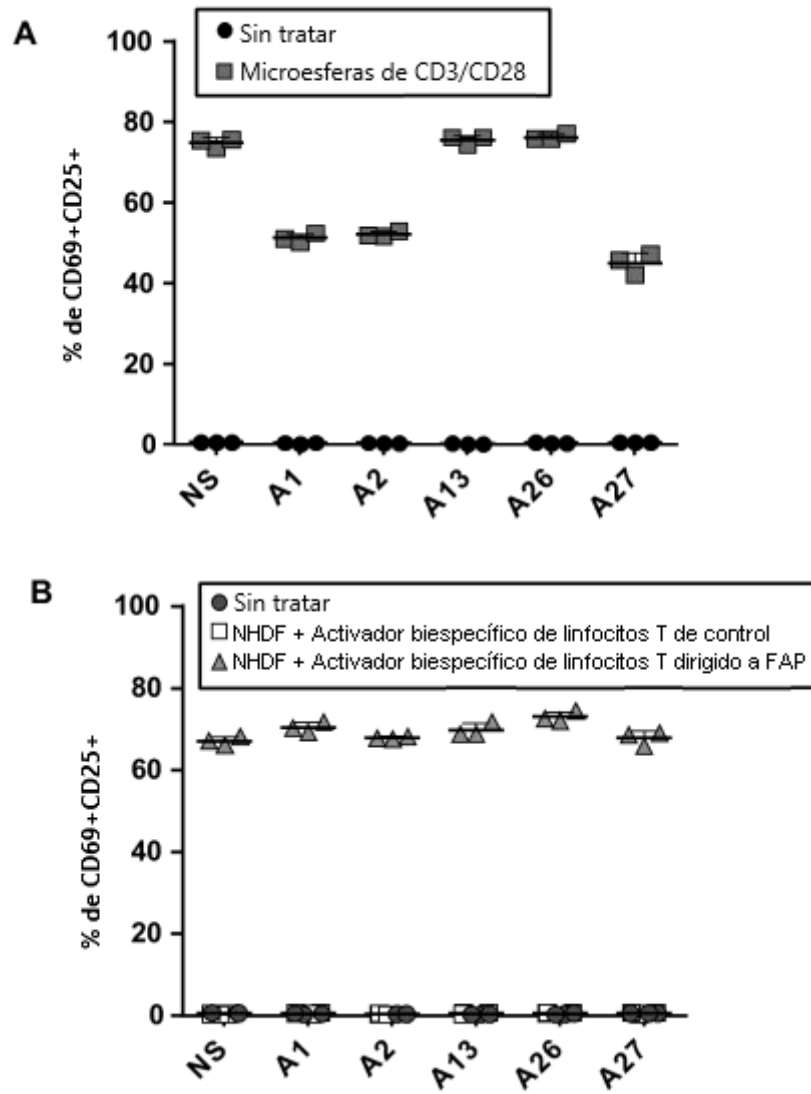
Figura 42

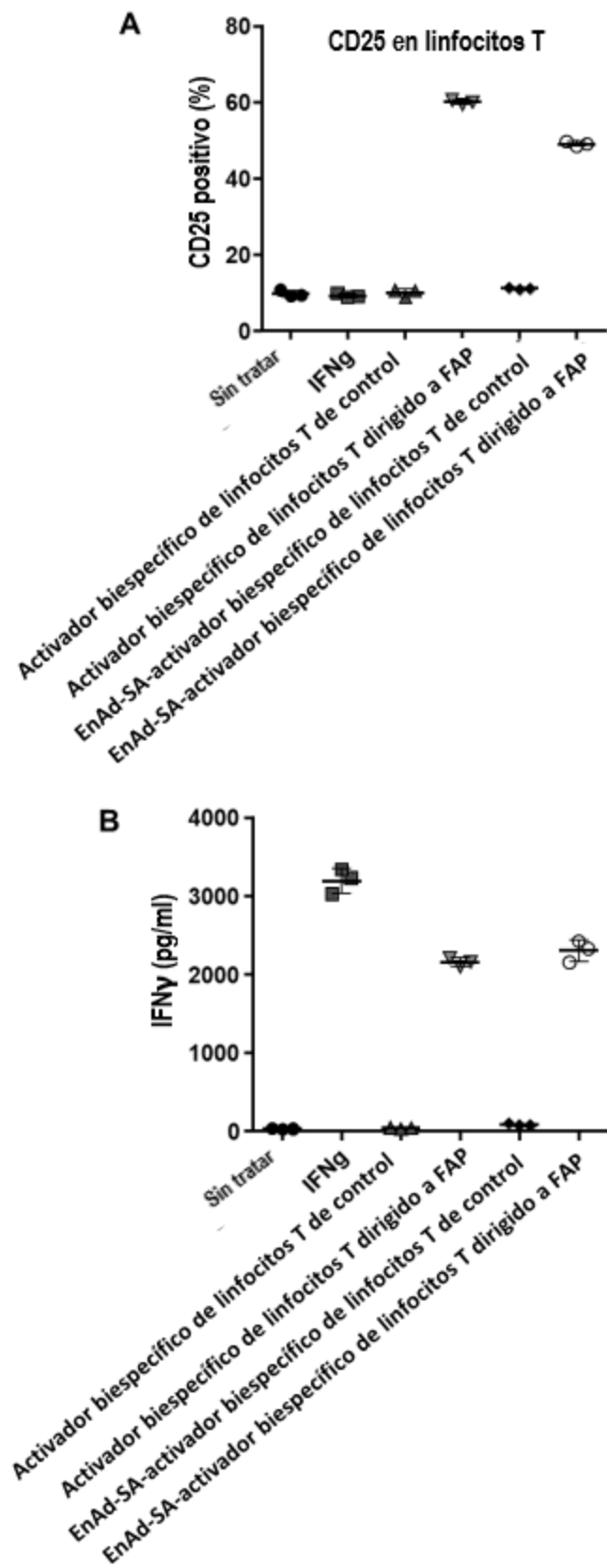
Figura 43

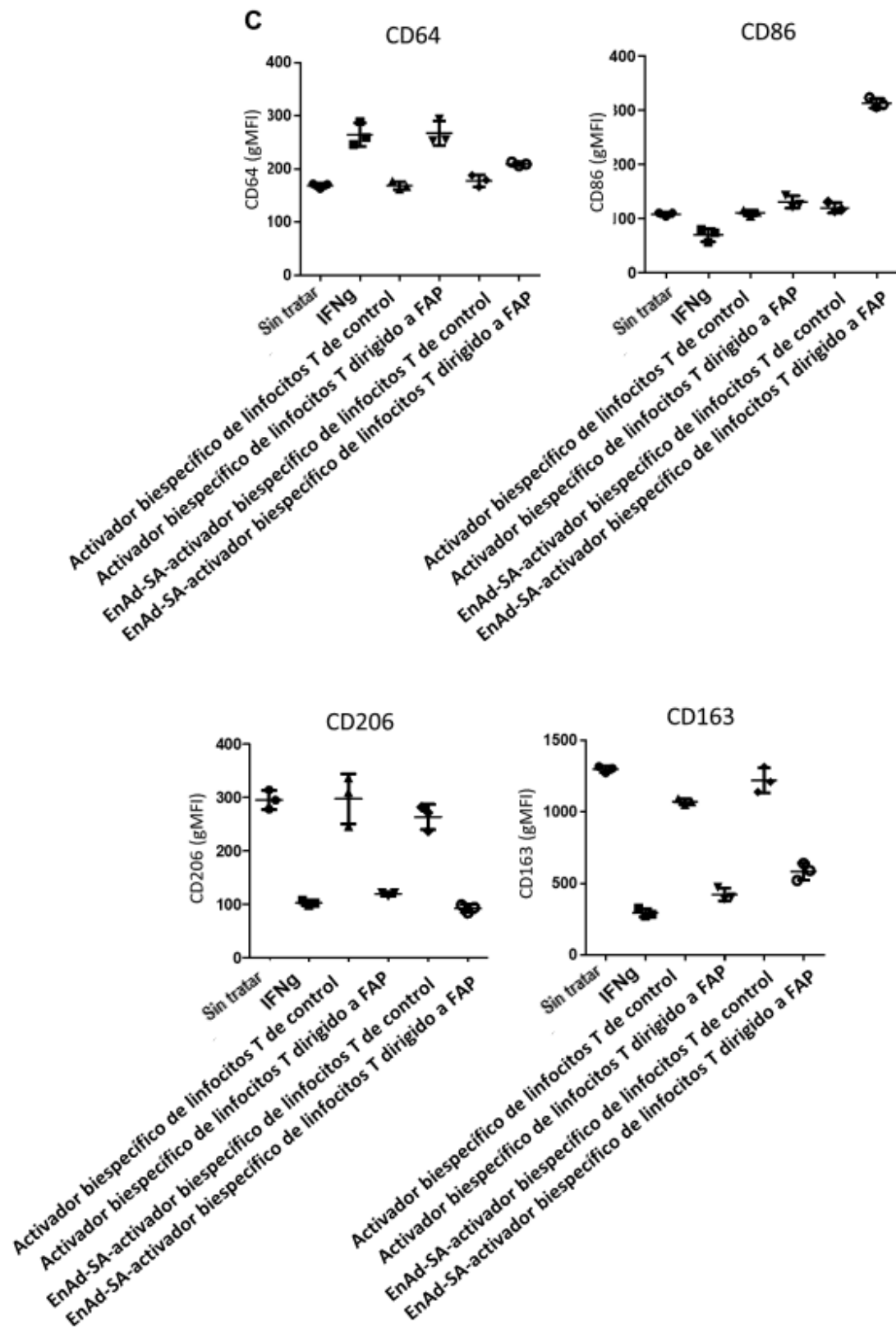
Figura 43 cont.

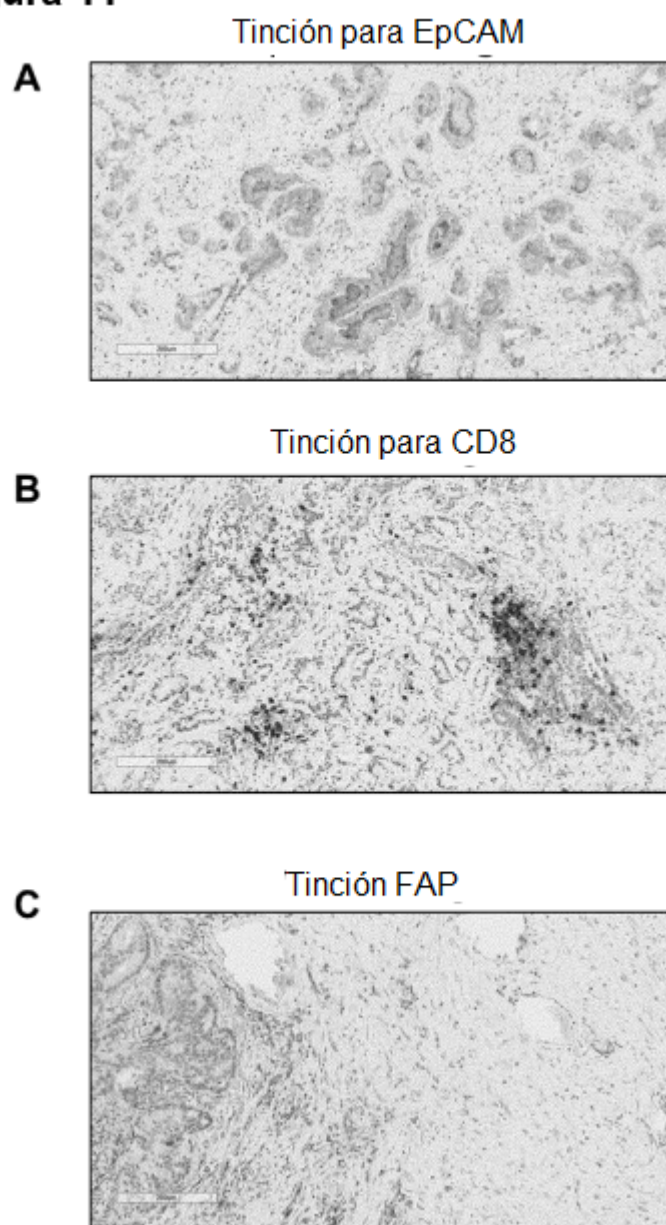
Figura 44

Figura 44 Continuación**D**

Sin tratar

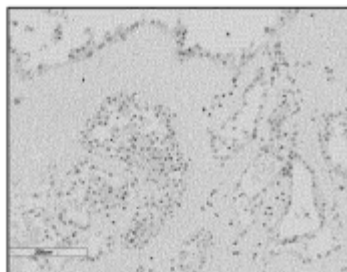
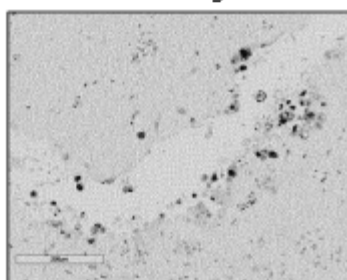
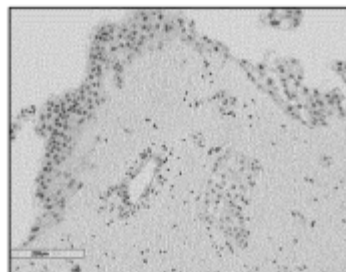
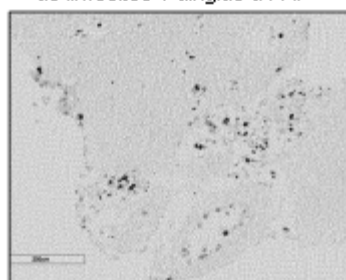
EnAd-CMV- Activador biespecífico
de linfocitos T dirigido a FAPEnAd-CMV- Activador biespecífico
de linfocitos T de controlEnAd-SA- Activador biespecífico
de linfocitos T dirigido a FAP

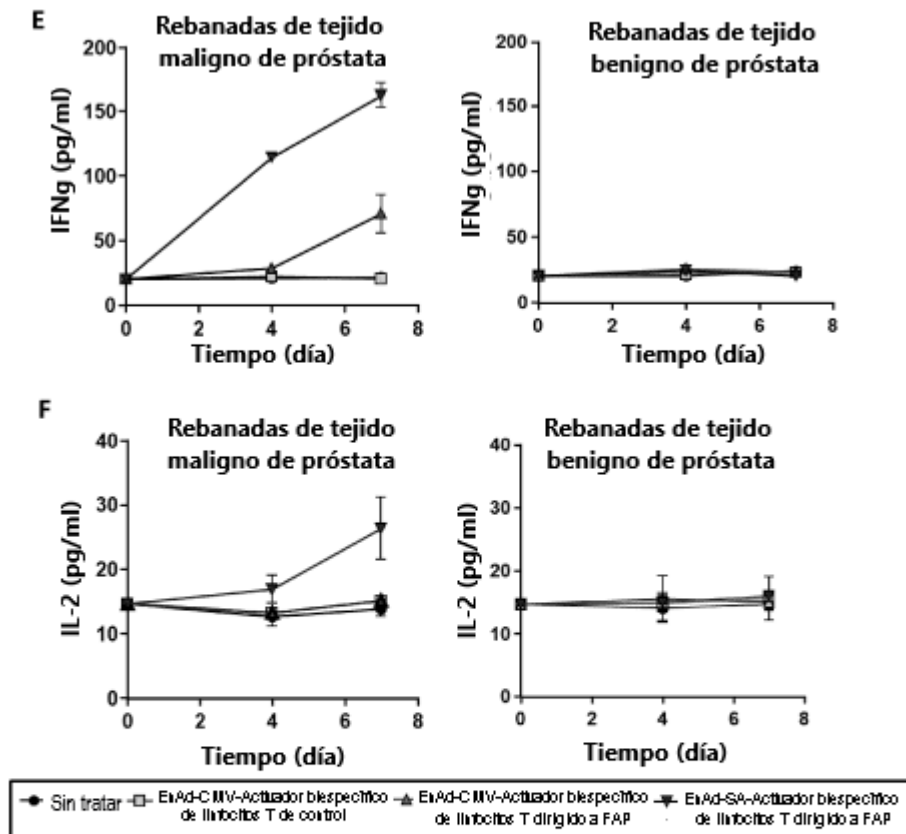
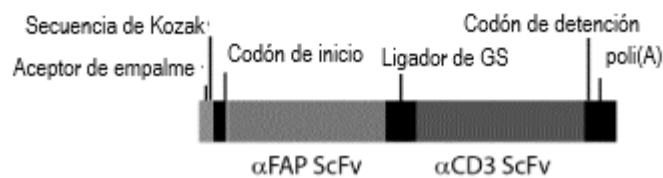
Figura 44 Continuación**Figura 45**

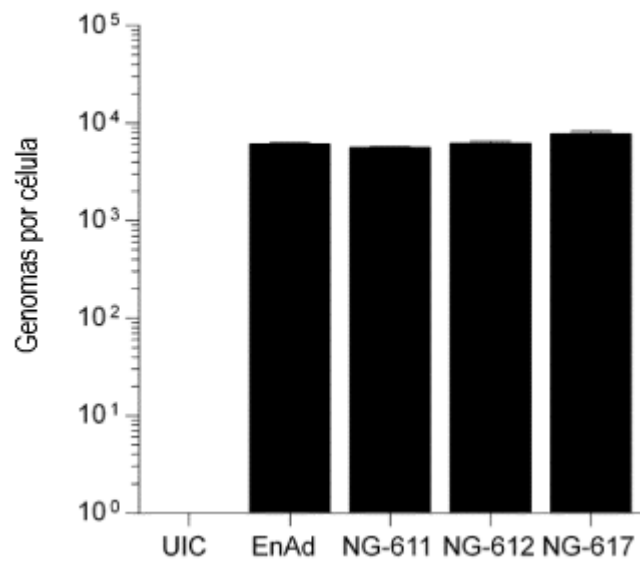
Figura 46

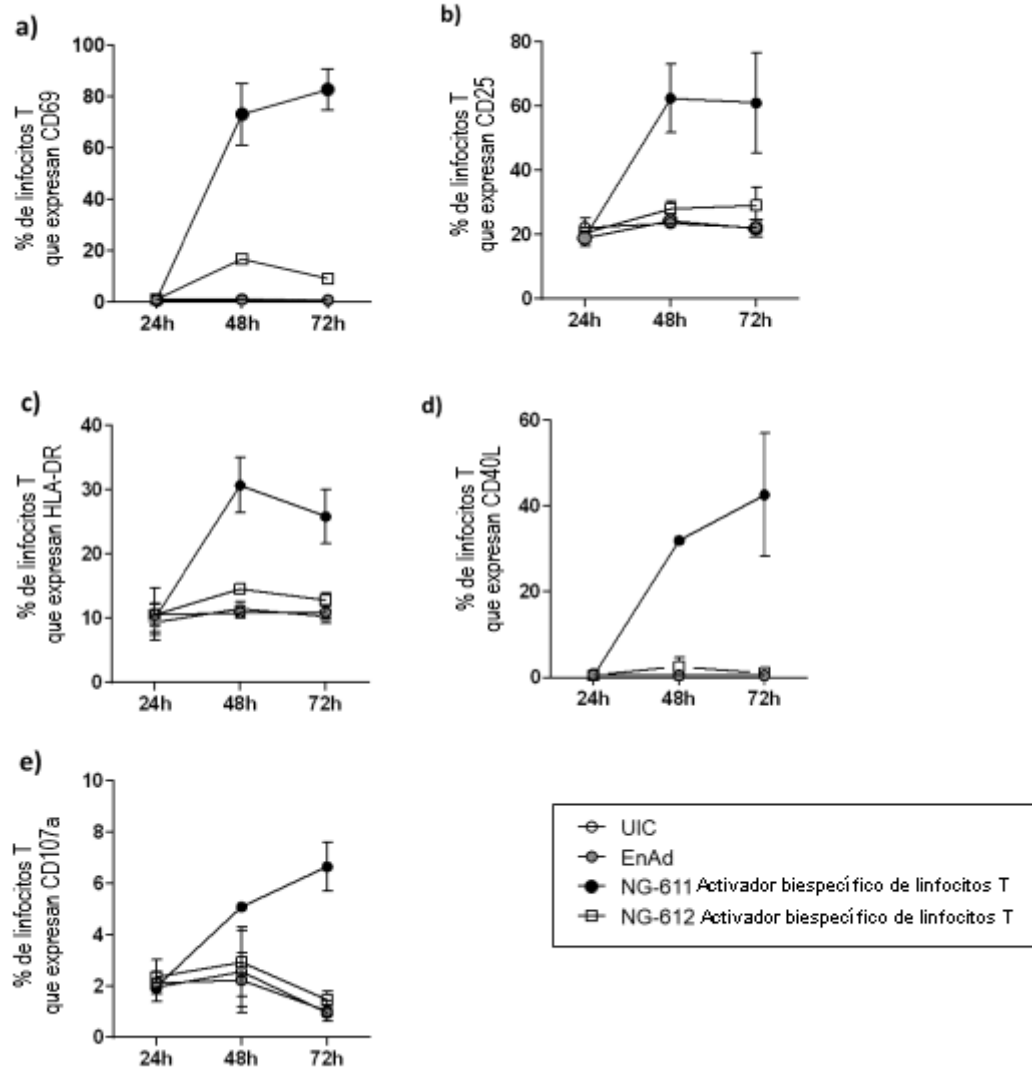
Figura 47

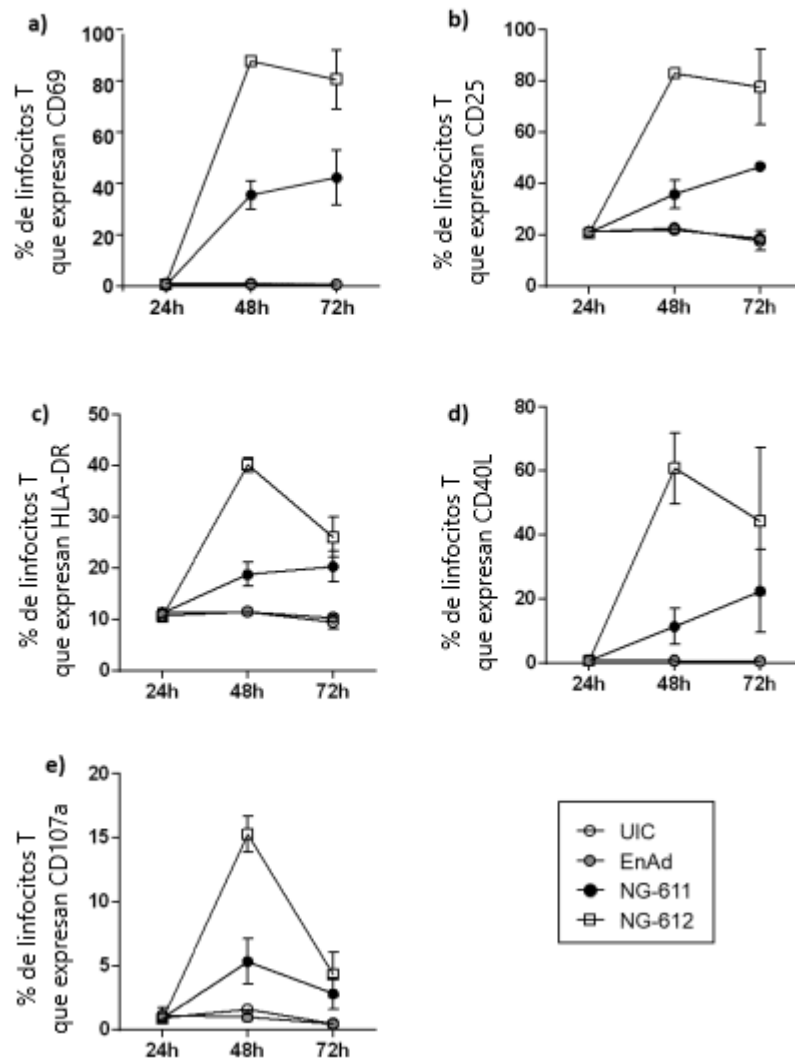
Figura 48

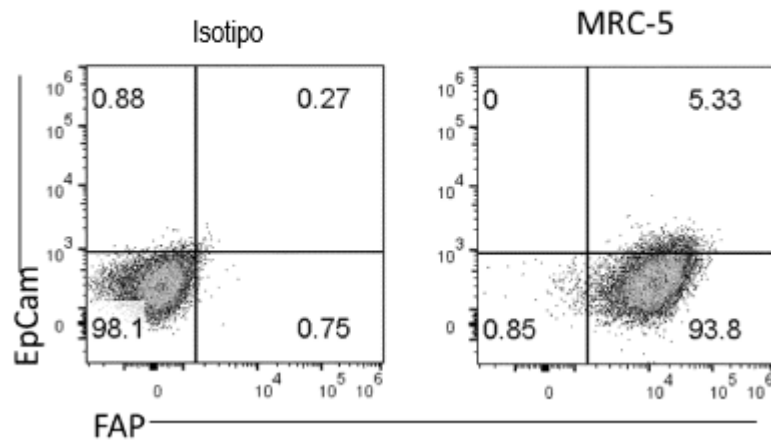
Figura 49

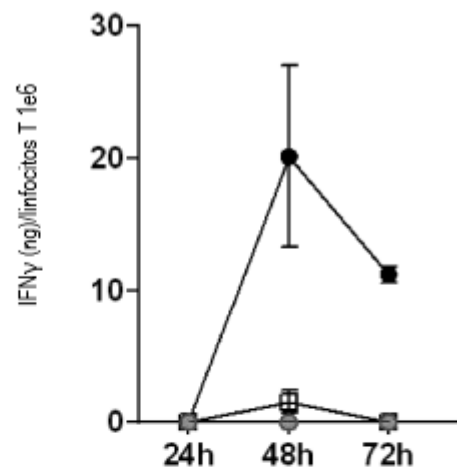
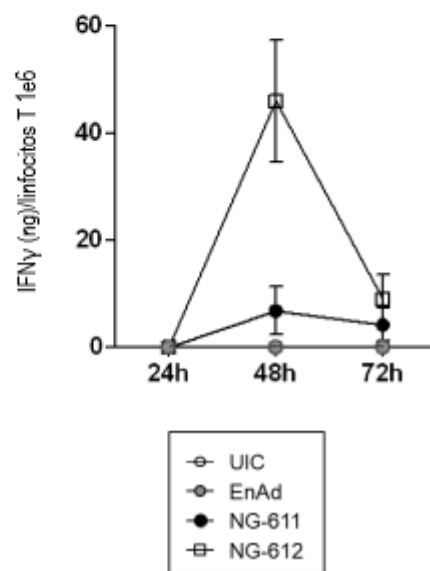
Figura 50A**Figura 50B**

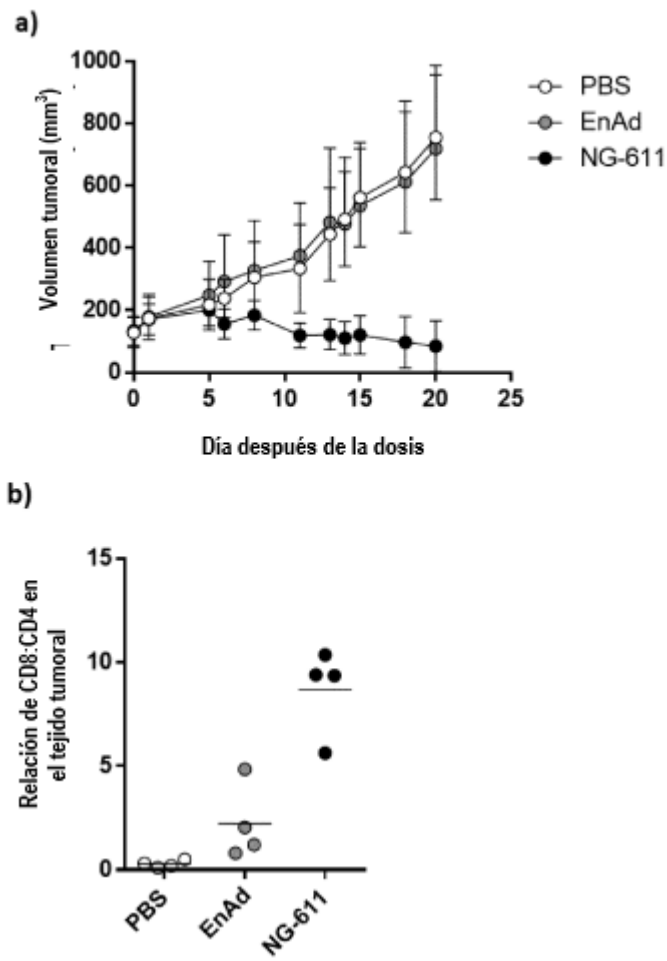
Figura 51

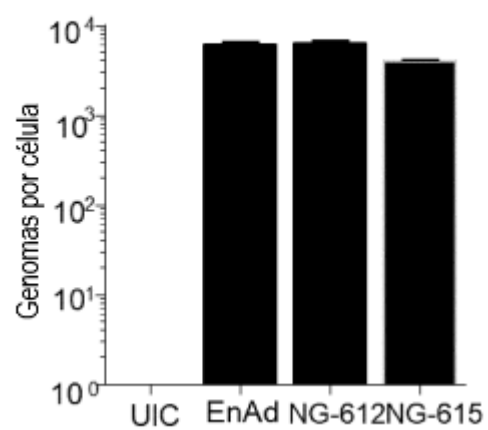
Figura 52

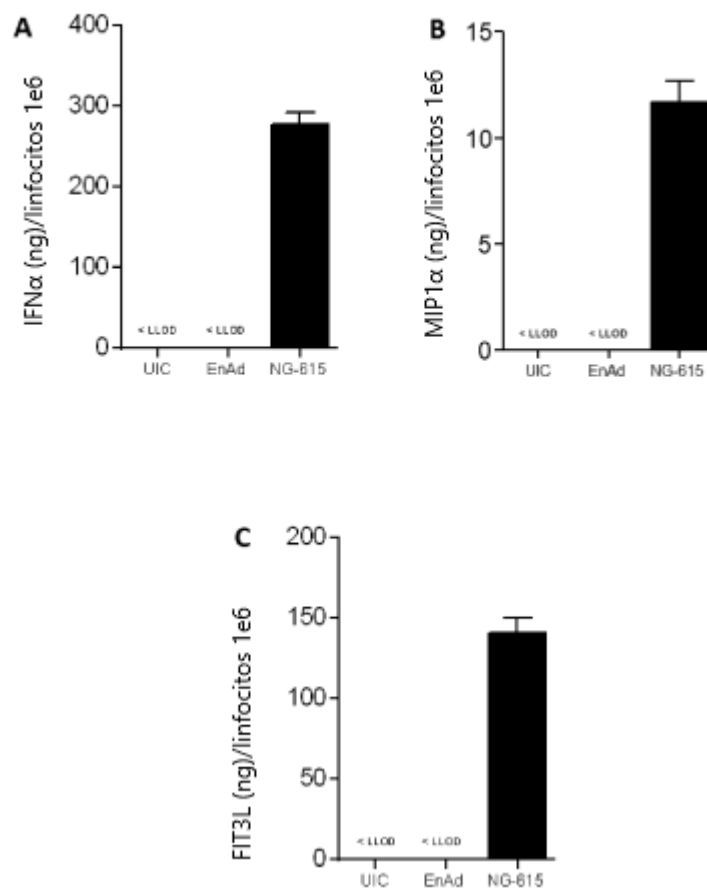
Figura 53

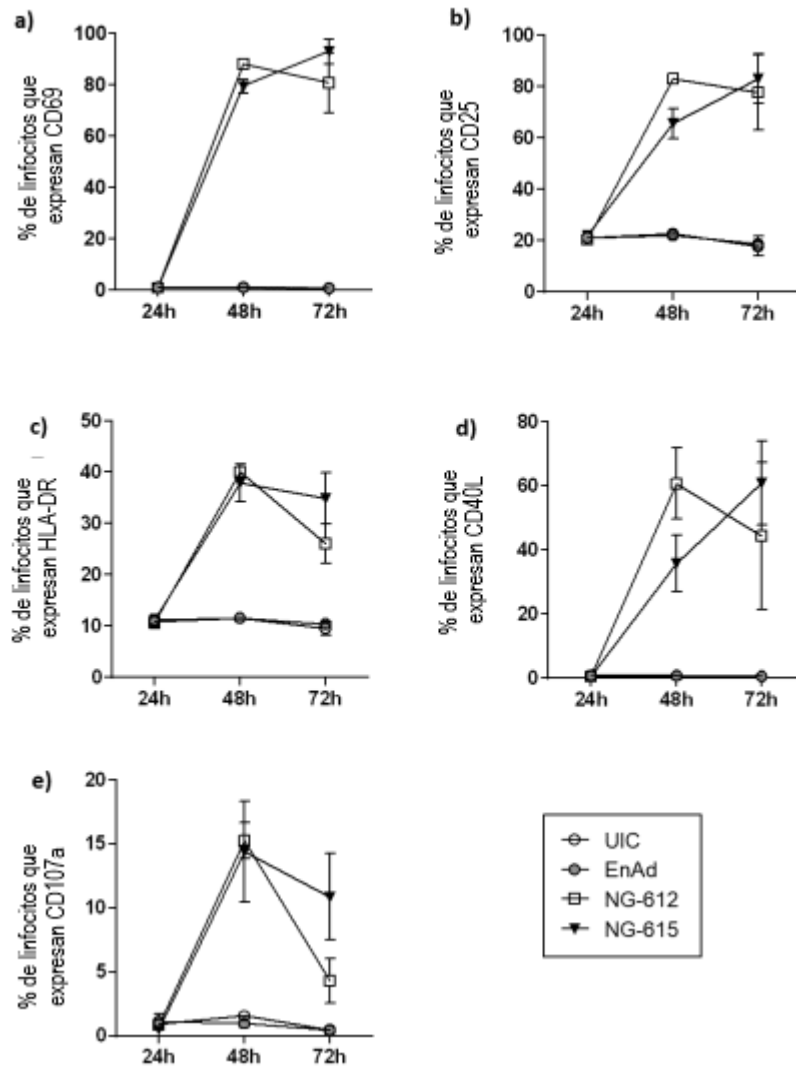
Figura 54

Figura 55